

GLUCOSEAUFNAHME, ADENOSINTRIPHOSPHAT UND
OSMOTISCHE RESISTENZ VON TRÄGERERYTHROCYTEN

Franz Stark

1981

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München

Vorstand : Prof. Dr. N. Zöllner

GLUCOSEAUFNAHME, ADENOSINTRIPHOSPHAT UND OSMOTISCHE RESISTENZ
VON TRÄGERERYTHROCYTEN

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von

Franz Stark

München

1981

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität
München

Berichterstatter: Prof. Dr. N. Zöllner

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 13. November 1981



INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN.	5
2.1	Material	5
2.2	Versuchsanordnung	5
2.3	Versuchsaufbau	7
2.4	Glucosebestimmung	7
2.5	ATP-Bestimmung	9
2.6	Osmotische Resistenz	10
3.	ERGEBNISSE	11
3.1	Einschluß von radioaktiv markiertem PVP in Trägererythrocyten als Nachweis der reversiblen Hämolyse	11
3.2	Glucoseaufnahme von normalen, intakten Erythrocyten und von Trägererythrocyten .	12
3.3	Verhalten der zellulären ATP-Spiegel . .	15
3.4	Osmotische Resistenz	16
4.	DISKUSSION	19
5.	ZUSAMMENFASSUNG	39
6.	TABELLEN	
	TEIL 1	40
	TEIL 2	56
7.	ABBILDUNGEN	63
8.	LITERATURVERZEICHNIS	103
9.	ANHANG	113

1. E I N L E I T U N G

Es ist lange bekannt, daß Erythrocyten in hypoosmotischen Lösungen anschwellen, sich öffnen, dabei Zellinhalt entleeren und sich unter isoosmotischen Verhältnissen wieder reversibel verschließen (PONDER 1948).

Die Möglichkeit, während dieses Vorgangs Moleküle in die Erythrocyten einzuschließen, wurden wiederholt beschrieben (HOFFMAN 1958, IHLER et al 1973). So wurde Ferritin, kolloidales Gold, Enzyme und Chemotherapeutika in die Erythrocyten eingeschlossen. Dies geschah überwiegend in Erythrocyten, deren Zellinhalt zum großen Teil entleert war. Solche Zellen wurden aufgrund der leeren Membranhüllen als Erythrocytenschatten oder englisch "erythrocyte ghosts" benannt.

Die Verwendung von Erythrocytenschatten ("ghosts") als abbaubare Trägersysteme für exogene Enzyme in der Behandlung angeborener Stoffwechselkrankheiten wurden von IHLER et al unter Verwendung der reversiblen direkten Hämolysen vorgeschlagen (IHLER 1973). Gleichzeitig und unabhängig davon beschrieben ZIMMERMANN et al ein Verfahren des dielektrischen Durchbruchs, das unter isoosmotischen Bedingungen den Einschluß therapeutisch wirksamer Substanzen erlaubt und auf deren therapeutische Verwendungsmöglichkeit hingewiesen wurde.

SPRANDEL et al konnten durch vergleichende methodische Untersuchungen nachweisen, daß mit einer Methode der reversiblen hypotonen Hämolysen mehr als ein Drittel der zugefügten Pro-

teine eingeschlossen werden können (SPRANDEL et al 1979a), und der Membrantransport, der Zellinhalt und die Morphologie normalen Erythrocyten ähnlich ist (SPRANDEL et al 1979b, 1979c, HUBBARD et al 1979a, HUBBARD et al 1980a). Dagegen konnten mit der Methode der direkten Hämolyse um etwa 8%, mit der Methode des dielektrischen Durchbruchverfahrens lediglich 3% der zugefügten Makromoleküle eingeschlossen werden (SPRANDEL et al 1981a, CHALMERS et al 1981). Ebenso waren der Zellinhalt erheblich erniedrigt und die Morphologie der Erythrocyten erheblich verändert (SPRANDEL et al 1979b, SPRANDEL et al 1980a).

Vergleichende Untersuchungen mit verschiedenen Spezies haben ergeben, daß in vitro erhebliche Spezies-Unterschiede bestehen: die Präparation von Erythrocytenschatten von Ratten war unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht möglich, da es stets zu Kristallbildungen kommt, was rasterelektronenmikroskopisch belegbar ist (SPRANDEL et al 1981b). Erythrocytenschatten von Meerschweinchen zeigten sich so instabil, daß sie für weitere Untersuchungen in vitro und in vivo ausschieden (SPRANDEL et al 1981b). Erythrocytenschatten von Kaninchen erschienen rasterelektronenmikroskopisch als Echinocyten und wiesen bei deutlich verminderter osmotischer Resistenz einen raschen initialen Abbau in vivo auf (SPRANDEL 1981b, SPRANDEL 1980b). Bei Erythrocytenschatten von Mäusen kam es zu einem erheblichen Verlust von zellulärem ATP. Solche Zellen zeigten im Vergleich zu normalen Erythrocyten eine stark verkürzte Überlebenszeit in vivo. Die Rege-

neration von zellulärem ATP führte zu einer erheblichen Verlängerung der in vivo-Überlebenszeit von Erythrocytenschatten von Mäusen, obwohl diese im Vergleich zu normalen Erythrocyten noch deutlich kürzer war (HUBBARD et al 1980b). Normale zelluläre ATP-Spiegel in Erythrocytenschatten konnten durch Inkubation in Adenosin-haltigem Medium erzielt werden. Dabei zeigt die in vivo - Überlebenszeit derartiger Erythrocytenschatten keinen Unterschied zu normalen Erythrocyten im Hund (SPRANDEL et al 1980c, SPRANDEL et al 1981c). Diese Zellen unterscheiden sich weder im Zellinhalt, Membrantransport, Morphologie noch in der Überlebenszeit von normalen Erythrocyten und sind darüberhinaus noch in der Lage, exogene Moleküle zu befördern.

Zur eindeutigen Abgrenzung von den herkömmlichen leeren Membranhüllen der Erythrocytenschatten ("ghosts") wurde der Begriff "Trägererythrocyten" (SPRANDEL et al 1980a) bzw. "carrier erythrocytes" (SPRANDEL et al 1980c) vorgeschlagen und inzwischen von anderen Autoren (DELOACH und BARTON 1981) übernommen.

Da die Trägererythrocyten zur Anwendung im Menschen kommen sollen, bedarf es der Beachtung vieler Aspekte in vitro, bevor klinisch-experimentelle Untersuchungen in vivo durchgeführt werden können. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, Kenntnisse über die osmotische Resistenz zu erhalten, die gleichermaßen für die Überlebenszeit in vitro, d.h. für die Beurteilung der Lagerungsfähigkeit als auch für die Überlebenszeit in vivo bedeutsam ist, d.h. für die Beurteil-

ung des intravasalen Abbaus. Der Energiestoffwechsel der Erythrocyten spielt die wesentliche Rolle für die Überlebenszeit von Erythrocyten, die gelagert und/oder transfundiert werden. Da umfangreiche und äußerst gründliche Untersuchungen bei normalen Erythrocyten bekannt sind, wurden die Glucoseaufnahme und die zellulären ATP-Spiegel als Vergleichsparameter zur Beurteilung des Energiestoffwechsels herangezogen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

Die Versuche wurden ausschließlich mit heparinisiertem menschlichem Blut durchgeführt, das sofort nach der Blutentnahme bei 4 Grad C aufbewahrt und unverzüglich verarbeitet wurde.

2.2 PRÄPARATION VON ERYTHROCYTENSCHATTEN

Nach der Blutentnahme werden die Erythrocyten dreimal in Puffer A (150 mM NaCl, 5 mM K₂HPO₄, pH 7.4) gewaschen: dabei wird Blut in Zentrifugengläschen bis zur Hälfte vollgefüllt und etwa 5 ml Puffer A hinzugegeben. Zur guten Vermengung wird das Röhrchen einigemal geschüttelt. Danach wird das Röhrchen 10 Minuten lang bei 4 Grad C und bei 1100 g zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand abgesaugt und das Röhrchen wiederum mit Puffer A aufgefüllt. Dieser Vorgang wird insgesamt dreimal durchgeführt.

Zur Herstellung von "ghosts" werden Dialyseschläuche zum Aufweichen in Puffer A eingelegt. Danach werden in das Dialysesäckchen 4 ml Erythrocyten (aus obigem Vorgang) und 1 ml Puffer A eingefüllt. Dieser Puffer enthält normalerweise die einzuschließende Substanz: im Falle der Kontrollexperimente 125-J Polyvinylpyrrolidon (PVP). Die Dialysesäckchen werden verschlossen, mit einem Bändchen an einem Glasstab befestigt und dann in ein Plastikgefäß eingeschlossen, welches hypo-

osmotischen Puffer B (5 mM K_2HPO_4 / KH_2PO_4 , pH 7.4) enthält. Der Glasstab dient zur Stabilisierung des Dialysesäckchens im Plastikgefäß, welches im weiteren Verlauf in einem Rotationsgerät eingespannt wird und bei 4 Grad C 90 Minuten lang rotiert. Nach der Rotation wird aus dem Plastikgefäß der Puffer B entfernt und durch einen isoosmotischen Puffer (145 mM NaCl, 5 mM K_2HPO_4 / KH_2PO_4 , 5 mM Glucose, pH 7.4) ersetzt. Dieser Puffer wurde im folgenden als Puffer A bezeichnet. Puffer E enthielt zusätzlich in Puffer A 5 mM Adenosin und 4 mM Magnesium-Chlorid. Die Molaritäten der Glucose wurden entsprechend der Versuchsansätze zwischen 5, 10, oder 20 mM variiert. Das verschlossene Plastikgefäß wird danach erneut in den Rotator eingespannt und für weitere 30 Minuten lang bei 37 Grad C rotiert. Da dies zum Verschluß der Erythrocyten führt, wird dieser Vorgang in der internationalen Nomenklatur als "Resealing" bezeichnet.

Nach diesem Vorgang wird das Dialysesäckchen aus dem Rotationsgefäß entfernt und mit einer 5 ml Spritze das Hämolysat aus dem Dialysesäckchen entfernt und in ein Zentrifugenglas gegeben, welches etwa bis zur Hälfte aufgegossen wird. Der Rest des Zentrifugenglases wird wiederum mit Puffer A bzw. Puffer E aufgegossen und 15 Minuten lang bei 20 Grad C und bei 500 g zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand abgesaugt und der gleiche Vorgang zweimal wiederholt.

2.3. VERSUCHSAUFBAU

Erythrocytenschatten bzw. normale Erythrocyten, Erythrocytenschatten, die in Puffer A und Erythrocytenschatten, die in Puffer E präpariert werden, kamen zum Einsatz in einer Inkubationsreihe. Dabei werden 0,1 ml Zellen (aus dem obigen Verfahren) mit Puffer E versetzt und in einem Gefäß (Eppendorf-Tubes) zur Inkubation verschlossen. Die Inkubationstemperaturen betragen 4, 20 bzw. 37 Grad C. Die Inkubationszeiten betragen 0, 1, 2 3 und 24 Stunden. Dabei rotieren die Gefäße mittels eines Rotators. Zu den jeweiligen Abnahmezeiten werden die Gefäße in einer Eppendorf-Zentrifuge 20 sec lang zentrifugiert und im Überstand Glucose und in den Zellen ATP gemessen. Zur Bestimmung der osmotischen Resistenz wurde bei gleichen Volumenverhältnissen das zwanzigfache Volumen in Plastikreagenzgläsern eingesetzt.

2.4 GLUCOSEBESTIMMUNG

Die Gefäße werden nach der entsprechenden Zeit aus dem Inkubator entfernt und die Messung der Glucoseaufnahme durchgeführt. Nach der Zentrifugation in der Eppendorf-Zentrifuge über 1 min. wurden 0.1 ml des Überstandes mit 1 ml 0,3 N Perchlorsäure versetzt und erneut in der Eppendorf-Zentrifuge über 10 sec. zentrifugiert. Die Glucosebestimmung erfolgte photometrisch bei 365 nm mittels eines Hexokinase Reaktionsgemisches (GLUCO-QUANT von Diagnostica Boehringer Mannheim) nach Angaben des Herstellers.

Enteiweissung:	Oberstand	0,1	ml
	Perchlorsäure	1,0	ml

Zentrifugieren und davon 0,1 ml Oberstand abziehen zur Bestimmung von Glucose.			

Glucosebestimmung:	Oberstand	0,1	ml
	Reaktionsgemisch	2,0	ml

Mischen, in Küvette einfüllen und bei 365 nm Extinktion ablesen.			

Testprinzip:	GLUCOSE + ATP	HK -----	G-6-P + ADP
	G-6-P + NADP	G6P-DH -----	GLUCONAT-6-P + NADPH + H

Glucose wird durch das Enzym Hexokinase und durch das Coenzym ATP in Glucose-6-Phosphat (G-6-P) und ADP umgewandelt. In einer weiteren Reaktion wird das gebildete G-6-P durch das Enzym Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) und durch das Coenzym NADP nun zu Gluconat-6-Phosphat (Gluconat-6-P) umgewandelt. Das bei dieser Reaktion entstehende NADPH + H wird nun photometrisch bei 365 nm in einem Doppelstrahlphotometer (PERKIN-ELMER 550S) gemessen.

Reagenzien:	GLUCO-QUANT von Boehringer Mannheim
	Perchlorsäure 0,3 N

2.5 ATP-BESTIMMUNG

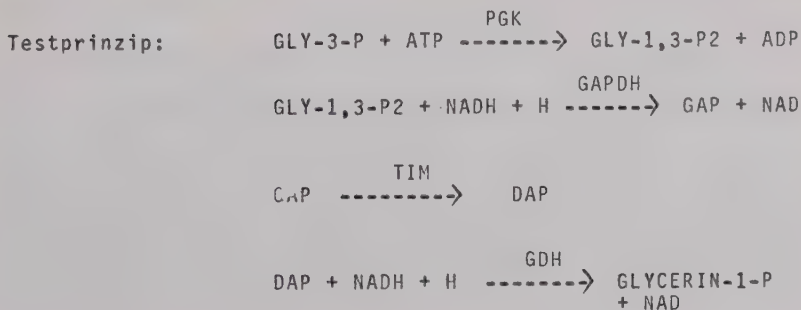
Die nach 2.4 vorbereitete Probe, die neben 0,1 ml Zellen noch 0,2 ml Puffer E enthält, wird mit 1 ml 0,6 N Perchlorsäure versetzt, 10 min bei Raumtemperatur stehengelassen, anschließend zentrifugiert in der Eppendorf-Zentrifuge und mit der ATP-TEST-COMBINATION (Boehringer Mannheim) nach Angaben des Herstellers die Verbrauchsmessung des ATP durchgeführt. Die quantitative ATP-Bestimmung erfolgt bei 365 nm durch photometrische Messung der Extinktionsdifferenzen E2 - E1 (PERKIN-ELMER 550S).

Ente Weissung:	Testsuspension	0,3	ml
	Perchlorsäure 0,6 N	1,0	ml

Mischen, 10 min. stehen lassen und dann zentrifugieren.

ATP-Bestimmung:	Überstand	0,1	ml
	Lösung 1	2,0	ml
	Lösung 2	0,2	ml

Bestimmung der Extinktion E1, dann Zugabe von Lösung-3, 10 min. warten und Bestimmung von Extinktion E2.



Glycerat-3-Phosphat (GLY-3-P) wird unter Mitwirkung des Coenzyms ATP durch ein Puffer-Glycerat-3-P-Gemisch (PGK) in Glycerat-1,3-Diphosphat (GLY-1,3-P₂) und ADP verwandelt. GLY-1,3-P₂ wird nun unter Mitwirkung des Coenzyms NADH + H durch das Enzym Glycerat-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) in Glycerat-Phosphat (GAP) umgesetzt. GAP wird weiterhin in DAP umgesetzt und DAP wird durch das Enzym Glycerin-Dehydrogenase (GDH) in Glycerin-1-Phosphat und NAD aufgespalten, welches dann photometrisch bestimmt werden kann.

Reagenzien: Perchlorsäure 0,6 N
 ATP-TEST-COMBINATION von Boehringer

2.6 OSMOTISCHE RESISTENZ

Die osmotische Resistenz wird durch Inkubation von Zellen in Lösungen stufenweise absteigender Osmolaritäten über die Hämoglobinfreisetzung bestimmt. Ausgehend von einer isotonischen NaCl-Lösung (0,9g% NaCl) wird eine Verdünnungsreihe: 0,9, 0,85, 0,8, 0,75 usw. bis 0,1 g% NaCl angesetzt. In 0,4 ml dieser Lösungen werden 0,1 ml der Zellen für 10 min unter ständigem Mischen inkubiert und danach mittels einer Eppendorf-Zentrifuge 20 sec lang zentrifugiert. Im Überstand wird der Hämoglobingehalt photometrisch (TEST-KOMBINATION von Boehringer Mannheim) erfaßt. Die maximale Hämoglobinkonzentration wird als 100%-ige Hämolyse bezeichnet und die Werte geringerer Hämoglobinkonzentration als Prozentsatz dieses Wertes angegeben und grafisch in Form einer Kurve dargestellt.

3. E R G E B N I S S E

3.1 Einschluß von radioaktiv markiertem PVP in Trägererythrocyten als Nachweis der reversiblen Hämolyse.

Zusatz von 125-J markiertem Polyvinylpyrrolidon (125-J-PVP) zum extrazellulären Puffer innerhalb des Dialysesäckchens führte zum Einschluß von 37% der zugefügten Aktivität in die Trägererythrocyten. Nach der Dialyse gegen hypoosmotischen Puffer und anschliessender Dialyse gegen isoosmotischen Puffer war in allen Fällen Hämoglobin in der extrazellulären Flüssigkeit, die durch Zentrifugation von den Erythrocyten abgetrennt und in ausgewählten Versuchen photometrisch auf ihren Hämoglobingehalt hin untersucht wurde. In Kontrollexperimenten, in denen die Dialyse anstatt gegen hypoosmotischen Puffer gegen isoosmotischen Puffer erfolgte und auch in der anschließenden Phase, in der isoosmotischer Puffer verwandt wurde, kam es zu keinem Einschluß von Radioaktivität. Aus der Tatsache, daß nach dreimaligem Waschen der Zellen die Radioaktivität im Bereich der Background-Werte gemessen wurde, wird verdeutlicht, daß auch keine Absorption des 125-J-PVP an die Erythrocytenmembran erfolgte.

3.2. Glucoseaufnahme von normalen, intakten Erythrocyten und Trägererythrocyten.

Die Glucoseaufnahme wurde in allen Versuchen an normalen Erythrocyten sowie an zwei unterschiedlichen Trägererythrocyten erfaßt, die erste Gruppe wurde ohne Zusatz von Adeno-

sin-Magnesium-chlorid (Puffer A), die zweite Gruppe mit Zusatz von Adenosin-Magnesium-Chlorid (Puffer E) präpariert, die im folgenden als Trägererythrocyten in Puffer A bzw. in Puffer E bezeichnet werden.

Sämtliche Zellen, die untersucht wurden, nahmen Glucose auf, d.h. der Gehalt der Inkubationsflüssigkeit nahm in allen Versuchen im zeitlichen Verlauf kontinuierlich ab. Dabei war die Glucoseaufnahme bei normalen Erythrocyten, Trägererythrocyten-A und Trägererythrocyten-E unter identischen Versuchsbedingungen, d.h. zum Beispiel gleiche Temperatur und gleiche Glucoseausgangskonzentration des Inkubationsmediums, in der gleichen Größenordnung. Es zeigte sich für den Zeitverlauf der ersten drei Stunden eine lineare Abnahme der Glucosekonzentrationen des Inkubationsmediums, und es kam damit zu einer linearen Glucoseaufnahme in den ersten drei Stunden. Der Durchschnitt der stündlichen Aufnahme von Glucose wird weiter unten gründlich analysiert.

Der durchschnittliche stündliche Verbrauch zwischen der dritten und der 24-igsten Stunde war deutlich niedriger in allen Experimenten als die durchschnittliche stündliche Glucoseaufnahme während der ersten drei Stunden. Daraus ist zu folgern, daß sich der lineare Verbrauch in diesem Zeitraum nicht fortsetzt und einer Funktion höherer Ordnung folgt oder die Glucoseaufnahme während der ersten drei Stunden nur annähernd linear ist und schon von Anbeginn einer Funktion höherer Ordnung folgt. Die Größenordnung der Glucoseaufnahme war

abhängig von der gewählten Temperatur: höhere Temperaturen waren von einem stärkeren Abfall der Glucosekonzentration im Inkubationsmedium, d.h. von einer größeren Glucoseaufnahme gefolgt als bei niedrigeren Temperaturen. Die durchschnittliche stündliche Glucoseaufnahme für die einzelnen Temperaturbereiche und der Inkubationsmedien sind in den Tabellen 1.1 - 14.1 wiedergegeben und in den Abbildungen 1.1 - 14.1 veranschaulicht. Der prozentuale Abfall der Glucosekonzentrationen von ihrem Ausgangswert (= 100%) und damit die prozentuale Glucoseaufnahme ist in Tabellen 1.2 - 14.2 wiedergegeben und in den Abbildungen 1.2 - 14.2 aufgezeigt. Dieser Effekt ist auch bei Glucoseaufnahme während 24 Stunden der gleiche und wird in Abbildung 21 klar veranschaulicht.

Aus Abbildung 21 wird auch der Einfluß der Glucosekonzentrationen der Inkubationsmedien auf den Glucoseverbrauch der Zellen deutlich. Je höher die gewählte Glucosekonzentration des Inkubationsmediums ist, desto höher ist auch die Glucoseaufnahme der Zellen pro 24 Stunden. Betrachtet man nur die initialen drei Stunden, so wird deutlich, daß die Glucoseaufnahme in den Inkubationsmedien von 10 mM Glucose gegenüber der von 5 mM deutlich erhöht ist. Dagegen befindet sich die Glucoseaufnahme während der ersten drei Stunden in 10 mM und 20 mM Glucoselösung im gleichen Größenbereich (Tabellen 4 - 8 und Abbildungen 4 - 8). Betrachtet man die prozentualen Werte der Glucoseaufnahme, so erkennt man, daß bei Inkubationsmedien von 5 und 10 mM Glucose die Aufnahme im gleichen Bereich liegt. Die prozentuale Aufnahme von Glucose in 20 mM Inkubationsmedium ist jedoch niedriger als bei Glucosemolaritäten

von 5 mM oder 10 mM. Absolut gesehen bestehen daher Unterschiede in der Glucoseaufnahme der Erythrocyten, die von der Ausgangskonzentration des Inkubationsmediums abhängen.

Auf Abbildung 21 und den oben angeführten Tabellen (1-14) wird erkenntlich, daß das Ausmaß der Glucoseaufnahme von Erythrocyten und Trägererythrocyten stärker durch die Molarität der Glucose im Inkubationsmedium als durch die Temperatur beeinflusst wird. So ist die Glucoseaufnahme in 10 mM Glucoselösung bei 4 Grad C höher als bei 37 Grad C in 5 mM Glucosepuffer. Die niedrigste Glucoseaufnahme findet sich daher bei 4 Grad C in 5 mM Glucoselösung und beträgt im Durchschnitt 0.15 micromol / ml Zellen während der ersten drei Stunden bzw. 0.54 micromol / ml Zellen während der ersten 24 Stunden (Tabelle 1.1 und Abbildung 1.1). Die höchste Glucoseaufnahme wurde analog bei 37 Grad C in 20 mM Glucosepuffer (0.70 micromol / ml Zellen) gemessen, die Maximalaufnahme beträgt 2.30 micromol / ml Zellen bei 37 Grad C in 20 mM Glucosepuffer in 24 Stunden.

Die oben genannten Ergebnisse werden alle in Inkubationsmedien erzielt, die Adenosin (5 mM) als energiereiches Substrat sowie Magnesium-Chlorid (4 mM) enthalten. Der Austausch von Adenosin gegen Adenin, Inosin bzw. das Weglassen von Adenosin führten zu deutlich unterschiedlicher Glucoseaufnahme pro Stunde bzw. während 24 Stunden. Die stärkste Glucoseaufnahme wurde in Gegenwart von Adenosin gemessen (Tabellen 11-12 und Abbildungen 11-12). In Gegenwart von

Inosin zeigte sich die Glucoseaufnahme verringert (Tabellen 13-14 und Abbildungen 13-14). Noch geringer war die Glucoseaufnahme in Gegenwart von Adenin (Abbildung 10) und am geringsten bei Fehlen energiereicher Substrate (Tabellen 19-20).

3.3 Verhalten der zellulären ATP-Spiegel.

In allen Experimenten kommt es zu einem Abfall der zellulären ATP-Spiegel in Erythrocyten und in beiden Präparationsformen der Trägererythrocyten während des Zeitverlaufs der Versuche. Sämtliche Ausgangswerte der zellulären ATP-Spiegel lagen bei normalen Erythrocyten und Trägererythrocyten, die in Gegenwart von Adenosin präpariert wurden, im physiologischen Bereich. Dieser Abfall an zellulärem ATP war in gleicher Größenordnung bei Erythrocyten und Trägererythrocyten, die in Gegenwart von Adenosin als energiereiches Substrat präpariert wurden. Trägererythrocyten, die nicht in Gegenwart von Adenosin und Magnesium-Chlorid inkubiert wurden, zeigten im Vergleich zu normalen Erythrocyten niedrigere ATP-Spiegel. (Tabellen 15 - 17 und Abbildungen 15 - 17). Trägererythrocyten, die ohne Adenosin und Magnesium-Chlorid präpariert wurden, wiesen in den ersten zwei Stunden einen rascheren Abfall auf als normale Erythrocyten oder Trägererythrocyten, die in Gegenwart von Adenosin und Magnesium-Chlorid präpariert wurden. Der weitere Abfall an zellulärem ATP verhielt sich dann in allen Zellen im gleichen Bereich.

Der Abfall der zellulären ATP-Spiegel war abhängig von der Temperatur des Inkubationsmediums: je höher die Temperatur, desto größer der zelluläre ATP-Abfall. Der Abfall war am geringsten bei 4 Grad C, wobei hier nach 24 Stunden noch Werte im unteren Normbereich gefunden wurden.

Der Abfall von zellulärem ATP war bei höheren Glucosemolaritäten des Inkubationsmediums während der ersten zwei Stunden geringer als bei niedrigeren Molaritäten. Nach drei Stunden zeigte sich jedoch größenordnungsmäßig überwiegend ein Abfall, der auch in den folgenden 21 Stunden keine Abhängigkeit von den Molaritäten und insbesondere von höheren Temperaturen (37 Grad C) erkennen ließ. Ausgeprägter stellte sich der Effekt der Abhängigkeit der Molarität von der Glucosemolarität bei 4 Grad C dar: so kam es bei Glucosekonzentrationen von 5 mM nach 24 Stunden zu einem deutlich niedrigeren ATP als in Glucosekonzentrationen von 10 mM.

3.4 Osmotische Resistenz

Normale Erythrocyten zeigen ein einheitliches Verhalten der osmotischen Resistenz: d.h. die Zellen werden bei gleicher Osmolarität hämolysiert und die Kurve der osmotischen Resistenz zeigt einen steilen Verlauf. Normale Erythrocyten, die bei 37 Grad C 24 Stunden in Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer inkubiert waren, zeigten nahezu das gleiche Verhalten (Abbildung 22). Trägererythrocyten zeigten in allen Fällen eine Veränderung der osmotischen Resistenz: in sämtlichen Fällen kam es zur Abflachung des Kurvenverlaufes, d.h. die

Zellentkapselungen bei unterschiedlichen Osmolaritäten zur **Hämolyse**. Eine wesentliche Beobachtung war, daß in allen Fällen der Trägererythrocyten bereits bei Osmolaritäten, die nur gering unter der Osmolarität des Blutes lagen, bereits hämolsierten. Unterschiedlich jedoch war das Ausmaß der früh einsetzenden Hämolyse. Trägererythrocyten, die ohne Adenosin präpariert waren, waren bereits bei blutisoosmotischen Werten zu 8 % hämolsiert. Bei sinkender Osmolarität kam es zu einer stufenweisen Hämolyse. Bei der Osmolarität, bei der es zur Hämolyse normaler Erythrocyten kommt, waren dabei schon 50% der Zellen hämolsiert, d.h. die Hämolyse zeigte 50% ihres Maximalwertes. Der weitere Kurvenverlauf war steiler und mehr dem Verlauf normaler Erythrocyten ähnlich (Abbildungen und Tabellen 22 - 24). Die gleichen Trägererythrocyten zeigen nach 24-stündiger Inkubation bei 37 Grad C 15% Hämolyse, der weitere Anstieg der Hämolyse bei sinkender Osmolarität erfolgt erheblich rascher und 90% der Zellen sind bereits hämolsiert zu einem Zeitpunkt, wo normale Erythrocyten erst zur Hämolyse kommen. Trägererythrocyten, die in Gegenwart von Adenosin (Puffer E) präpariert wurden, zeigten unmittelbar nach der Präparation im Vergleich zu den vorgenannten Zellen eine weitaus niedrigere Tendenz zur Hämolyse an den vergleichbaren Osmolaritäten. So waren bei blutisotonen Werten lediglich 2% der Zellen hämolsiert, der Anstieg war flacher und zum Zeitpunkt der Hämolyse normaler Erythrocyten waren erst 40% der Zellen hämolsiert. Die in diesem Bereich nicht hämolsierten 60% der Erythrocyten zeigten sich dagegen wesentlich resistenter als normale Erythrocyten: die

Hämolyse dieser Zellen trat erst wesentlich später auf. Trägererythrocyten, die in Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer (Puffer E) präpariert und 24 Stunden bei 37 Grad C inkubiert wurden, zeigten bei hohen Osmolaritäten etwa das gleiche Verhalten wie analoge Zellen, die unmittelbar nach der Präparation untersucht wurden. Im weiteren Verlauf bei abnehmenden Osmolaritäten nahm die Hämolyse nicht mehr wesentlich weiter zu. Eine plötzliche Zunahme der Hämolyse erfolgt bei geringfügig höheren Osmolaritäten als bei normalen Erythrocyten. Zum Zeitpunkt der Hämolyse normaler Erythrocyten waren daher bereits 30% dieser Zellen hämolysiert. Die anderen 70% dieser Trägererythrocyten zeigten sich jedoch weitaus resistenter als normale Erythrocyten, wobei es zur kompletten Hämolyse erst bei Osmolaritäten kam, die 0,1 g% NaCl entsprechen. Ein wesentliches und immer wiederkehrendes Phänomen mit Trägererythrocyten war, daß die Hämolyse mit abfallenden Osmolaritäten in stufenweiser Form zunahm. Aus diesem Grunde wurde mit Abbildung 24 ein typischer Kurvenverlauf abgebildet. Bei Abbildung von Mittelwerten geht dieser Effekt der Anschaulichkeit verloren.

4. DISKUSSION

Durch den Einschluß von ^{125}J markiertem PVP in die Erythrocyten konnte nachgewiesen werden, daß die Zellen während der Dialyse gegen hypoosmotischen Puffer eröffnet und bei der Dialyse gegen isoosmotischen Puffer reversibel wieder verschlossen wurden. Der Anteil der zugefügten Radioaktivität, der in die Trägererythrocyten eingeschlossen wurde, war bei Anwendung dieser Technik in der gleichen Größenordnung wie bei anderen Autoren (SPRANDEL et al 1979a, HUBBARD et al 1980a, DELOACH and IHLER 1977, DALE et al 1977). ^{125}J markiertes PVP wurde als Testparameter gewählt, da es sich hierbei um ein Molekulargewicht von 30000-40000 Dalton handelt und damit ein aktiver oder passiver Transport über die Erythrocytenmembran völlig ausgeschlossen werden kann. Da diese Substanz in der medizinischen Diagnostik Anwendung findet, ist sie zu vergleichsweise niedrigen Kosten auf dem Markt verfügbar und als Gammastrahler meßtechnisch leicht zu verfolgen. Durch die Kontrollexperimente, in denen keine Hämolyse durchgeführt wurde und PVP während der gesamten Präparationsperiode im Außenmedium vorhanden war, konnte nachgewiesen werden, daß PVP nicht an die Erythrocytenmembran absorbiert wird. Daher ist der Prozentsatz der Radioaktivität von der gesamt zugefügten Radioaktivität allein auf die zum Einschluß gelangten Moleküle zurückzuführen. Der Einschluß von 37% der zugeführten Radioaktivität berücksichtigt dabei bereits den immer zu beobachteten Verlust an Zellen, der je nach Versuch etwa 10 - 20 % beträgt. Gemeinsam mit der Tatsache, daß Hämoglobin konstant im Außenmedium gefunden

wurde, wird hierdurch belegt, daß die Zellen im Gegensatz zu normalen Erythrocyten eröffnet und wieder verschlossen wurden. In dieser Weise präparierte Erythrocyten bezeichnet man als Erythrocytenschatten bzw. im englischen Sprachgebrauch als "erythrocyte ghosts", da es sich dabei um leere Membransäckchen handelt, die üblicherweise keinen zellulären Inhalt mehr aufweisen. Die üblichen Präparationstechniken zur Herstellung von Erythrocyten (ghosts) zielten dahin, den Zellinhalt und im besonderen das Hämoglobin völlig zu entleeren, bevor die Membran wieder verschlossen wird. Ein Vergleich der beiden am häufigsten angewendeten Techniken zur Präparation der Erythrocytenschatten, die nach Entleerung des Hämoglobins völlig weiss aussehen und daher auch als "white ghosts" bezeichnet werden, wird von SCHWOCH und PASSOW (1972) gegeben.

Präparationstechniken, bei denen ein bestimmter Anteil von Hämoglobin zurückbleibt, führen zu Erythrocytenschatten mit rosafarbenen bzw. hellrotem Aussehen, die daher als "pink ghosts" bezeichnet werden. Die hier gewählte Technik zur Präparation von Erythrocytenschatten hat es sich zur Aufgabe gemacht, den intraerythrocytären Inhalt möglichst im Erythrocyten zu belassen. Bereits in früheren Arbeiten konnte nachgewiesen werden, daß bei Anwendung einer Dialysemethode Hämoglobin und die anderen löslichen intrazellulären Bestandteile in hohem Prozentsatz intrazellulär zurückgehalten werden können, so daß diese Werte sich noch im Bereich der physiologischen Norm bewegten (SPRANDEL et al 1979b, DELOACH and

IHLER 1977). Dies stellt die Voraussetzung dafür dar, mit therapeutischen Wirkstoffen beladene und wiederverschlossene Erythrocyten solange als möglich in Zirkulation zu halten. Verminderung einer oder mehrere Enzyme des Energiestoffwechsels kann bereits zu einer erheblichen Verkürzung der in vivo Überlebenszeit der Erythrocyten führen. Zum Beleg seien hierfür die klassischen hämolytischen Anämien angeführt, die zum Teil durch intrazellulären Enzymmangel oder durch Enzymopathie verursacht sind und mit deutlich verkürzter Überlebenszeit einhergehen.

Ausgehend von der Hypothese, daß Erythrocyten, die in allen wesentlichen Parameteren normalen Erythrocyten sich ähnlich sind, sei es in Zellinhalt, Membrantransporteigenschaften, in der Morphologie, oder in physikalischem Verhalten, die längste Überlebenszeit nach Reinjektion aufweisen werden, wurden ausgedehnte methodische Untersuchungen und Vergleiche hinsichtlich dieser Parameter in früheren Arbeiten durchgeführt. (SPRANDEL 1979, SPRANDEL et al 1979b, SPRANDEL et al 1979c, HUBBARD et al 1980a, SPRANDEL and CHALMERS 1980, SPRANDEL et al 1981d). Ein hoher Prozentsatz an intrazellulären Bestandteilen kann erreicht werden, indem das Verhältnis des Intrazellulärvolumens zum Extrazellulärvolumen so hoch als möglich gehalten wird, d.h. der Anteil der Erythrocyten im Dialysesack gegenüber dem isoosmotischen Puffer möglichst hoch ist, der die einzuschließenden Moleküle enthält.

Wachsender Zellanteil, d.h. wachsender Hämatokrit im Dialysesack, erfordert zum optimalen Einschluß extrazellulärer Sub-

stanzen zunehmende Dialysezeiten, da die Viskosität zunimmt. Ständigem Mischen kommt dabei eine wesentliche Bedeutung zu, ohne hinreichendes Mischen konnte nur 3% der zugefügten Aktivität eingeschlossen werden (SPRANDEL et al 1979a). Die Inkorporation wurde in der vorliegenden Arbeit bei einem Hämatokrit von 80% durchgeführt, da nur bei einem Hämatokrit von 80 - 90 % davon ausgehen kann, daß alle Zellen eröffnet und wieder verschlossen werden (SPRANDEL et al, unveröffentlichte Ergebnisse). Der intrazelluläre Bestandteil an Hämoglobin, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD) und LDH betrug dabei 80-90% der Werte, die in den gleichen normalen Erythrocyten gemessen wurden und befand sich damit im physiologischen Bereich. Untersuchungen der Membrantransporteigenschaften haben ergeben, daß in den so präparierten Zellen der Natriumtransport intakt ist, sich von normalen Zellen in beiden Richtungen nicht unterscheidet und es sich dabei um einen aktiven, durch Strophantin-G hemmbaren Transport handelt. (SPRANDEL 1979b et al). Es darf daher davon ausgegangen werden, daß die aktiven Transportmechanismen und der Kationentransport durch den Präparationsvorgang nicht beeinträchtigt wurden. Der Transport der Glucose, der Energiequelle des Erythrocyten, ist in normalen Erythrocyten und in den Erythrocytenschatten sehr rasch ($T_{1/2}$ zwischen 5 und 10 sec) und durch Phlorrizin als auch durch Quecksilberchlorid hemmbar. (SPRANDEL et al 1979b). Auch der Transport anderer Substanzen wie Harnsäure, Phenylalanin oder organischer Säuren, die als Substrate für spätere Untersuchungen Bedeutung besitzen, unterscheidet sich nicht in normalen Erythrocyten und Ery-

throcytenschatten und zeigte jeweils symmetrisches Verhalten (SPRANDEL et al 1979b, HUBBARD et al 1980a). Die Morphologie von Erythrocytenschatten, die rasterelektronenmikroskopisch untersucht wurden, zeigte erhebliche Abweichungen von der bikonkaven Form, falls die Untersuchungen mittels einer früher beschriebenen Dialysemethode (DALE et al 1977) durchgeführt wurden. Diese Zellen waren überwiegend schalenförmig, daneben fanden sich jedoch eine Vielfalt morphologischer Formen wie Echinocyten, ineinander verdrehte Erythrocyten, Zellen mit tiefen Einstülpungen und Akantocyten (SPRANDEL and CHALMERS 1980, SPRANDEL et al 1981d). Methodische Verbesserungen, insbesondere schonende Zentrifugation (unter 500 G) sowie Erhalt der intrazellulären ATP-Spiegel im Normbereich führten zur Herstellung von Erythrocytenschatten, die sich von normalen Erythrocyten in keiner Weise unterscheiden und bikonkave Formen aufwiesen (SPRANDEL et al 1981d). Diese Zellen überlebten in Untersuchungen am Hund (Beagle) wie normale Erythrocyten mit einer Halbwertszeit von 18 Tagen. Erythrocytenschatten, die durch direkte Dilution oder die durch ein dielektrisches Durchbruchverfahren präpariert wurden, überlebten in vivo nur wenige Stunden (SPRANDEL et al 1980c, SPRANDEL et al 1981a).

Frühere Untersuchungen über die Überlebenszeit von verschlossenen Erythrocytenschatten in Hunden sowie in Mäusen zeigten den wesentlichen Einfluß eines intakten Stoffwechsels des Erythrocyten für die Überlebenszeit in vivo (SPRANDEL et al 1980a, HUBBARD et al 1980b). Erythrocytenschatten von Hunden überlebten auch unter optimalen Bedingungen nur mit einer

Halbwertszeit von 7 Tagen. Da diese Zellen unter die Norm erniedrigte ATP-Spiegel aufwiesen, wurden Erythrocytenschatten durch Zusatz von Adenosin, Magnesium-chlorid und Glucose inkubiert, und dadurch die zellulären ATP-Spiegel wieder in den physiologischen Wertebereich angehoben. Solche Erythrocytenschatten mit normalen ATP-Spiegeln überlebten mit einer Halbwertszeit im Kreislauf von 18 Tagen und erreichten damit die gleiche Halbwertszeit, die bei normalen Erythrocyten im Hund (Beagle) gefunden wurden (SPRANDEL et al 1980a). Die Präparation von Erythrocytenschatten von Mäusen war ebenfalls von einem erheblichen Abfall der zellulären ATP-Werte unter 30% der Ausgangswerte gefolgt. Diese Zellen überlebten in vivo mit einer Halbwertszeit von weniger als 1 Stunde und waren nach 4 Stunden praktisch nicht mehr nachweisbar. Zusatz von Glucose (5 mM) und Adenosin oder Inosin (je 5-10 mM) zu den Dialyse- und Puffern der Wasch- und Inkubationslösungen erlaubte die Präparation von Erythrocytenschatten, die zelluläre ATP-Spiegel aufwiesen, die nur ein Drittel unter den Ausgangswerten lagen. Diese Zellen wiesen einen geringeren initialen Verlust auf und zeigten eine Halbwertszeit von 4 Stunden. Danach jedoch war der weitere Abbau sehr verzögert und nach nahezu 7 Tagen waren noch nahezu 25% der injizierten radioaktiv markierten Erythrocytenschatten in Zirkulation noch nachweisbar (HUBBARD et al 1980b). Die Bedeutung der zellulären ATP-Spiegel und damit des intakten Energiestoffwechsels der Erythrocyten für eine lange Überlebenszeit läßt sich aus diesen Untersuchungen klar ableiten.

Für die zukünftige Verwendung von beladenen Trägererythrocyten in vivo ist der Aspekt der optimalen Behandlung während der Präparation in vitro, d.h. also die Periode vor der Reinjektion in den Kreislauf von wesentlicher Bedeutung. Da die Beladung der Trägererythrocyten mit Enzymen oder Pharmaka an spezielle Laboreinrichtungen gebunden sein wird, ist es unausweichlich, daß dies immer wieder zu mehr oder weniger langen Lagerungszeiten führen wird, sei es durch den Transport oder durch die Erfordernis, sie vor der Injektion aufzubewahren. Da aus Untersuchungen am Hund und an der Maus, wie oben ausgeführt, erkenntlich war, spielt die ausreichende Versorgung dieser Zellen mit Glucose eine wesentliche Rolle, insbesondere für die Überlebenszeit dieser Zellen kurz nach der Injektion. Durch ausreichende Versorgung mit Glucose und den Erhalt von physiologischen zellulären ATP-Spiegeln konnte der ansonsten zu beobachtende frühe Verlust (early loss) der beladenen Zellen vermieden werden. Das ist von entscheidender Wichtigkeit, da es andererseits rasch zu Freisetzung der eingeschlossenen Substanzen und damit zu toxischen oder allergischen Reaktionen kurz nach der Injektion kommen könnte. Aus diesem Grund wurde das Verhalten der Zellen in den ersten 3 Stunden nach der Präparation erfaßt - das entspräche etwa der Zeit, in der diese Zellen ans Krankenbett und zur Injektion gelangen könnten, sowie nach 24 Stunden, das entspräche dem Zeitintervall für längere Transporte.

Diese Studie sollte daher feststellen, welche Molarität an Glucose und Adenosin im Inkubationsmedium benötigt werden, um für diese Zeiträume ausreichend Substrate für den Energie-

stoffwechsel der beladenen Erythrocyten bereitzustellen. Darüberhinaus sollte untersucht werden, inwieweit sich normale Erythrocyten in dieser Hinsicht von beladenen Trägererythrocyten unterscheiden. An dieser Fragestellung orientierend wurden daher Inkubationsmedium verschiedener Glucosekonzentrationen gewählt und die Abnahme dieser Glucosekonzentrationen im extrazellulären Inkubationsmedium photometrisch erfaßt. Es handelt sich daher um die Aufnahme der Glucose in die Erythrocyten, die durch mehrere Faktoren, wie Glucosetransport über die Membran, Bindung von Glucose und Hämoglobin und Abbau der Glucose über den Emden-Meyerhof-Stoffwechselweg bestimmt werden. Aus diesem Grund wurden die Ergebnisse in zwei Formen dargestellt, zum einen in der Aufnahme an Glucose ausgedrückt in % der ursprünglich im Inkubationsmedium befindlichen Glucose, als auch berechnet in Glucoseaufnahme in micromol/ml Zellen.

Die identischen Ergebnisse bei normalen Erythrocyten und bei Trägererythrocyten belegen, daß der Präparationsvorgang zu keiner Änderung der Glucoseaufnahme führte. In Verbindung mit den Ergebnissen von SPRANDEL et al (1979b), die keine Unterschiede im Glucosetransport über die Membran ergaben, kann daraus geschlossen werden, daß die Bindung der Glucose an Hämoglobin und der Abbau der Glucose über den Emden-Meyerhof-Stoffwechselweg unbeeinflußt von der Präparation blieben.

Die lineare Zunahme der Glucoseaufnahme während der ersten 3 Stunden belegt, daß der Vorgang der Aufnahme in diesem Zeit-

raum noch kein Gleichgewicht erreicht. In Verbindung mit der wesentlich geringeren Glucoseaufnahme zwischen der dritten und 24. Stunde muß angenommen werden, daß ein solches Gleichgewicht, sei es im Hinblick auf Glucosetransport oder Glucosebindung, eintritt und die dann geringere Glucoseaufnahme insbesondere zu Lasten des Glucoseabbaus geht. Dabei kann vermutet werden, daß die Glucosebindung an das Hämoglobin ein wesentlicher Faktor ist, da der Transport über die Erythrocytenmembran mit einer Halbwertszeit von etwa 10 sec anzusetzen ist (SPRANDEL et al 1979b) und daher nicht als zeitlimitierender Faktor in Frage kommt. Bei Verwendung von 3 Volumenteilen Inkubationslösung und einem Teil Erythrocyten war bei allen Glucosekonzentrationen (5, 10, 20 mM) auch noch ausreichend Glucose im Inkubationsmedium nach 24 Stunden. Die Ergebnisse lassen jedoch den Schluß, daß die Verwendung gleicher Molaritäten und ein Volumenverhältnis 1:1 diese Glucosekonzentrationen für eine Lagerung der Zellen über 24 Stunden insbesondere bei Raumtemperatur und bei 37 Grad C nicht ausreichend gewesen wären. Für die praktische Anwendung empfiehlt sich daher die Lagerung in 3 Volumen Inkubationsmedium von vorzugsweise 5 mM Glucose bei 4 Grad C.

Da die Glucoseaufnahme mit zunehmender Glucosekonzentration im Außenmedium ebenfalls zunimmt, wird der Effekt der höheren Glucosekonzentration weitgehend ausgeglichen. Das Angebot einer größeren Glucosemenge an die Zellen für eine längere Lagerung sollte daher über niedrigere Glucosekonzentrationen bei größeren Volumina erfolgen. Umgekehrt ist es nicht sinnvoll, die zu lagernden Trägererythrocyten in kleine Volumi-

na-Konzentrationsmedien mit hoher Glucosekonzentration zu suspendieren. Zudem muss in kleineren Volumina aufgrund der Lactatproduktion mit ständig abnehmenden pH-Werten gerechnet werden, die sich für die Erythrocyten, wie unten angeführt, nachteilhaft auswirken würden. Passive Mechanismen, bedingt durch die Konzentrationsgradienten, müssen bei der Glucoseaufnahme diskutiert werden. Das wird zusätzlich unterstützt durch die Tatsache, daß die Steigerung der Glucoseaufnahme und durch die Zunahme der Temperatur nicht in dem Maße erfolgt, wie es bei Zugrundelegung thermodynamischer Enzymkinetik, z.B. durch beschleunigtem Abbau der Glucose, zu erwarten wäre. Es ist daher deutlich, daß ein wesentlicher Teil der Glucoseaufnahme nicht oder nur in sehr geringem Maße von der Temperatur beeinflusst wird. Die Glucoseaufnahme wird von anderen Autoren mit 0,3 mmol/l Erythrocyten innerhalb von 24 Stunden angegeben (STRUMIA 1954). Andere Autoren fanden den Glucoseverbrauch etwa in dergleichen Größenordnung und einen um den Faktor 100 höheren Verbrauch bei 37 Grad C (DeVERDIER et al 1964). Es ist lange bekannt, daß der Glucoseverbrauch während längerer Lagerung kontinuierlich abnimmt (PRANKERD 1956). Es konnte gezeigt werden, daß die Abnahme des Glucoseverbrauchs im gelagerten Blut durch die Abnahme des pH im Medium bedingt ist, deren Ursache die Lactatproduktion darstellt (KOCHOLATY und DAWSON, 1972). Zusatz von NaHCO_3 bringt den Glucoseverbrauch wieder in Normalbereiche (BISHOP 1962, GOLDEN and SHIELDS 1971).

Die Morphologie von Erythrocyten spielt eine erhebliche Rolle

in der Überlebenszeit in vivo. Erhebliche Abweichungen von der bikonkaven Form der Erythrocyten führt zu einer verkürzten Überlebenszeit und abnormale Formen finden sich in einer Reihe hämolytischer Erkrankungen (WEED and REED 1966). Der Einfluß von ATP auf die Zellform von Erythrocyten wurde von mehreren Autoren beschrieben. NAKAO et al. fanden bei erniedrigten zellulären ATP-Spiegeln in vitro erniedrigte osmotische Resistenz, verminderte Hexokinase-Aktivität und verminderte Glucoseaufnahme (NAKAO et al 1962). Solche Erythrocyten, die erniedrigtes zelluläres ATP aufwiesen (durch mehrwöchige Lagerung), verschwanden nach Transfusion zu 70-80% innerhalb weniger Stunden aus dem Kreislauf und nur die Zellen, die die initialen 12 Stunden überlebten, zeigten einen Abbau, der normalen, frischen Erythrocyten vergleichbar war. Die gleichen Autoren konnten zeigen, daß es zu einem raschen Anstieg von zellulärem ATP durch Inkubation in Adenin oder Adenosin oder Inosin kommt, und diese Zellen überlebten nach Transfusion im gleichen Maße wie normale Erythrocyten. Diese Zellen wiesen dann auch eine bikonkave Form auf und hatten eine osmotische Resistenz im Normalbereich sowie normale Hexokinaseaktivität und deutlich erhöhte Glucoseaufnahme. Nach längerer Lagerung der Zellen konnte gezeigt werden, daß die Inkubation in Inosin und Adenin wieder zu normalen ATP-Spiegeln und normaler Form der Erythrocyten führt. Die Verwendung von Inosin oder Adenin allein zeigte diesen Effekt jedoch nicht (NAKAO et al 1962). Wenn ATP in physiologischer Zellkonzentration vorliegt, sind bikonkave Erythrocyten zu beobachten. Unter einem bestimmten Wert kommt es zu Stechapfelformen und bei noch niedrigeren Werten zur Sphäro-

cytose. Lang andauernde Erniedrigung der zellulären ATP-Spiegel führte zu einer Erniedrigung der Hexokinaseaktivität und der osmotischen Resistenz, die beide auch nach Erreichen normaler ATP-Spiegel nicht mehr reversibel waren (NAKAO et al 1962). Mehrere Autoren haben berichtet, daß die Gegenwart von Adenosin im Inkubationsmedium zu normalen oder erhöhten ATP-Konzentrationen im Erythrocyten führt und somit die Erythrocytenüberlebenszeit bei Transfusionen verlängert wird. (NAKAO et al 1962, MOLLISON and ROBINSON 1959, OVERGAARD-HANSEN et al 1957). Adenosin hebt dabei die zellulären ATP-Spiegel wirksamer an als Inosin (OVERGAARD-HANSEN et al 1957). Es wurde angenommen, daß ein Teil des Adenosins direkt phosphoryliert wurde. Die Erhöhung der ATP-Spiegel war besonders ausgeprägt bei relativ hohen Konzentrationen von Adenosin. Untersuchungen des Adenosinstoffwechsels in menschlichen Erythrocyten haben gezeigt, daß eine hohe Abhängigkeit von der Konzentration des Adenosins besteht. Inkubation von Erythrocyten in Adenosin-haltigem Medium führt zu einem Abfall von Adenosin, zu einem Anstieg von ATP und insbesondere von Hypoxanthin (MEYSKENS and WILLIAMS 1971). Niedrige Adenosinkonzentrationen bedingen einen Anstieg von IMP, dagegen nicht von Insosin. Hohe Adenosinkonzentrationen dagegen sind gefolgt von hohen Inosin und niedrigen IMP-Konzentrationen. Es konnte gezeigt werden, daß Adenosin die organischen Phosphate innerhalb der Erythrocyten erhöhte und die anorganischen Phosphatspiegel erniedrigte (GABRIO et al 1955). In Gegenwart von Adenosin kommt es zu größerer Lactatproduktion als es dem Verbrauch von Glucose entspricht (LOWY et al

1958). Andere Untersuchungen haben gezeigt, daß Adenosin zu Lactatproduktion führt und den Kaliumeinfluß auch in Abwesenheit von Glucose fördert, wenn länger gelagerte Zellen bei 37 Grad C inkubiert werden (WHITTAM 1960).

Schon 1937 berichteten CONWAY und COOKE (1937), daß Adenosin durch Adenosin-Deaminase in Ammoniak und Inosin umgewandelt wird, was späterhin mehrfach bestätigt wurde (ABABEI und RAPAPORT 1961, MEYSKENS und WILLIAMS 1971). RUBINSTEIN und DENSTEDT (1956) fanden, daß Adenosin rasch im gelagerten Blut abnimmt und dadurch Ammoniak, Inosin und Hypoxanthin entsteht, wobei Ammoniak möglicherweise für einen Anstieg des pH verantwortlich ist. Adenosin enthält Ribose, die als Ribose-1-Phosphat durch Wirkung einer Nucleosid-Phosphorylase, die in Erythrocyten vorhanden ist, freigesetzt wird (GABRIO und HUENNEKENS 1955, HUENNEKENS et al 1956, SANDBERG et al 1955). Durch die Wirkung der Phosphoribomutase (GUARINO und SABLE 1955) kann Ribose-1-Phosphat in Ribose-5-Phosphat umgewandelt werden. Ribose-5-Phosphat ist ein Zwischenprodukt im Hexose-Monophosphat-Stoffwechselweg und dadurch kann die Glykolyse in Gegenwart von Adenosin aufrecht erhalten werden. Neben Adenosin sind andere Nucleoside wie Inosin, Xanthosin und Guanosin in der Lage, beim menschlichen Erythrocyten in diesen Stoffwechselweg einzuschreiten (RUBINSTEIN und DENSTEDT 1956). Dagegen zeigen sich die Deoxyformen der Nucleoside weniger wirkungsvoll. Im Gegensatz zu ihren phosphorylierten Formen werden die Nucleoside Adenosin und Inosin frei über die Zellwand transportiert. In der vorliegenden Arbeit wurde Adenosin der Vorzug gegenüber Inosin gegeben, da Adenosin in

vitro wirksamer sei, normale ATP-Spiegel zu unterhalten und da über die Freisetzung von Ammoniak während der Deamination höhere pH-Spiegel unterhalten werden, die für den Stoffwechsel des Erythrocyten von Vorteil sein sollen (RUBINSTEIN et al 1958). Ein weiterer Grund, Adenosin gegenüber Inosin den Vorzug einzuräumen waren eine Vielzahl von Berichten in der Literatur, die eine Überladung von Harnsäure nach Transfusionen beschrieben, die auf Inosin zurückgeführt wurde (SIMON 1962, SIMON et al 1962, VERDIER et al 1964a, 1964b, SIMON und SUGITA 1964, SUGITA and SIMON 1965, BEUTLER and DURON 1965b, HURN et al 1966, AKERBLOM et al 1967, NAKAO et al 1968, STRUMIA and STRUMIA 1969, DAWSON et al 1971). Adenosin war in allen Fällen in der Lage, bei Zellen, die über 1,2,3,4 oder 8 Tage gelagert wurden, die erniedrigten zellulären ATP-Spiegel wieder in den Normalbereich zurückzubringen. Schematisch gesehen geschieht die Umwandlung von ATP zu Hypoxanthin nach folgender Formel:



Der weitere Abbau von Hypoxanthin zu Harnsäure findet jedoch nicht innerhalb der Erythrocyten stattfinden, da sie keine Xanthinoxidase enthalten (LOWY et al 1963). Die Umwandlung von AMP zu IMP wird dabei als der richtungsweisende und irreversible Schritt in den Erythrocyten dargestellt (LOWY et al 1963). Auf dieser Stufe folgt daher der irreversible Verlust von ATP zu Hypoxanthin. Dagegen kann die Umwandlung von ATP, ADP und AMP durch die Wirkung der Adenylatkinase erfolgen. Adenin wurde ebenfalls untersucht, da der Wert

dieser Substanz zur Erhaltung normaler zellulärer ATP-Spiegel ebenfalls seit langem bekannt ist (NAKAO et al 1959) und Adenin den Abfall von ATP, ADP und AMP zu verlangsamen mag (BARTLETT et al 1972). Dieser Effekt wurde von einer Reihe von Autoren bestätigt, die nachweisen, daß nicht nur Nucleoside, sondern auch Adenin zu erhöhten zellulären ATP-Spiegeln führt (LOWY et al 1961, BISHOP et al 1961, 1964b, SUGITA und SIMON 1965, MANOHAR et al 1967). Die anderen freien Basen, z.B. Guanin, Cytidin oder Hypoxanthin haben sich jedoch im Hinblick auf eine Anhebung der zellulären ATP-Spiegel als unwirksam erwiesen (SIMON 1962).

Ein bemerkenswertes Ergebnis dieser Arbeit war, daß der Abfall zellulärer ATP-Spiegel bei höheren Glucosemolaritäten des Inkubationmediums während der ersten zwei Stunden geringer war als bei geringeren Molaritäten. Ein solcher Effekt konnte in der Literatur nicht gefunden werden und ist auch aufgrund der vorliegenden Daten nicht zu erklären. Die Abhängigkeit des Abfalls der zellulären ATP-Spiegel von der Temperatur findet seine Bestätigung bei einer Vielzahl von Autoren (LOWY et al 1962, BARTLETT et al 1972, SIMON 1965). Von weitreichender Bedeutung für die weiteren Untersuchungen und die Anwendung von Trägererythrocyten ist die Feststellung, daß kein Unterschied zwischen der Verwendung von 1 mM und 4 mM Adenosin festzustellen war. Daraus ergibt sich, daß für zukünftigen Arbeiten die Präparation und die Lagerung der Zellen 1 mM Adenosin sicherlich ausreichend ist.

Die Verwendung niedriger Magnesium-chlorid-Spiegel - 1 mM

MgCl₂ statt 4 mM MgCl₂ - beeinflusste ebenfalls nicht den Abfall zelluärer ATP-Spiegel bzw. ihre Regeneration nach längerer Lagerung.

Mehrere Studien haben gezeigt, daß eine Beziehung zwischen der osmotischen Resistenz von Erythrocyten in hypotonen und ihrer geometrischen Zellform besteht (CASTLE und DALAND 1937, HOFFMAN et al 1958, WILLIAMS et al 1959). Normale Erythrocyten zeigen einen steilen Abfall der osmotischen Resistenz und es kommt in der Regel zur vollständigen Hämolyse in hypoosmotischen Lösungen, die einer Osmolarität von 0,4 g% NaCl-Lösung entsprechen. Inkubation normaler Erythrocyten für 24 Stunden bei 37 Grad C ohne irgendwelche Zusätze und unter sterilen Bedingungen führt zu einer Abflachung der Kurve der osmotischen Resistenz wie bereits Arbeiten von HAM and CASTLE (1940) belegten, d.h. die Hämolyse tritt bereits schon in höherosmolaren Lösungen auf. Der Vorgang der Hämolyse wurde ausführlichst von PONDER beschrieben (PONDER 1948). Im Falle von Erythrocyten, die ohne Zusätze gelagert werden, kommt es zum Verbrauch von Glucose, zu einem Abfall von ATP und über die Lactatproduktion zu einem Anstieg des pH-Wertes bei 37 Grad C innerhalb von 24 Stunden. Die Verminderung des zellulären ATP führt zu einem Nettoeinstrom von Natrium in die Zelle und zu einem Nettoverlust von Kalium aus der Zelle. Der Verlust von Kalium ist langsamer als der Einstrom von Natrium, so daß es zu einem Anstieg der Kationenkonzentrationen und zu einem Wassereinstrom in die Zelle kommt, um normale Kationenkonzentrationen aufrecht zu erhalten. Dies führt

zu einem Anschwellen der Zelle, zu vermehrtem Zellvolumen (MCV), die Zellen gehen von einer bikonkaven in eine sphärocytäre Form über und bedingen einen Anstieg des Hämatokrits (PONDER 1948, CHAPMAN et al 1971). Da das Zellvolumen größer ist, ist die Fähigkeit dieses Erythrocyten in hypotoner Salzlösung weiter anzuschwellen vermindert, was im Vergleich zu frischen Zellen zu einer erhöhten Hämolysebereitschaft führt. Parallel zu diesen Kationenänderungen spielt der Verlust von membrangebundenem Cholesterin ebenfalls eine wesentliche Rolle bei der Veränderung osmotischer Resistenz länger gelagerter Erythrocyten. Vermehrter Verlust von membrangebundenem Cholesterin führt über eine verminderte Membranoberfläche zu verminderter osmotischer Resistenz (MURPHY 1962). Unter den Bedingungen der osmotischen Resistenz, d.h. durch die rasche Inkubation von Erythrocyten in hypoosmotischen Lösungen kommt es aufgrund von Kationenverschiebungen zur Hämolyse. Normale Zellen verhalten sich wie Osmometer und schwellen in hypoosmotischen Lösungen von ihrer normalen bikonkaven Form bis zu kugeligen Gestalten mit einem etwa 50% größeren Volumen an (GUEST 1948, PONDER 1948). In diesem Stadium besteht das größtmögliche Volumen bei kleinstmöglicher Oberfläche, so daß die Membran keine weiteren elastischen Reserven mehr besitzt, weiterer Volumenanstieg zur Hämolyse führt und es zu strukturellen Veränderungen kommt, die es dem Hämoglobin und anderen Zellinhalten erlauben, aus der Zelle auszutreten (PONDER 1948). Das hat seine Richtigkeit unter den Bedingungen dieses standardisierten Tests, bei dem der osmotische Streß abrupt erfolgt. Allmähliche verzögerte osmotische Hämolyse dagegen, wie sie hier zur Präparation von Erythrocyten-

schatten verwandt wurden, zeigt, daß die Erythrocytenmembran in gewissen Grenzen elastisch ist (DANON et al 1954, DANON 1961, KATCHALSKY et al 1960). KWANT und SEEMAN konnten zeigen, daß auch Erythrocytenschatten die Funktion eines perfekten Osmometers besitzen (KWANT und SEEMAN 1970).

Der Test der osmotischen Resistenz hat seit über 40 Jahren seinen festen Platz in der hämatologischen Diagnostik und wird insbesondere zur Diagnose hämolytischer Anämien wie die hereditäre Sphärocytose eingesetzt (HAM und CASTLE 1940, YOUNG 1947, EMERSON et al 1947, YOUNG et al 1951, VARADI 1951, EMERSON et al 1956, DACIE und LEWIS 1968). Die hier berichteten Ergebnisse haben gezeigt, daß Erythrocyten, die in Glucose-Adenosin-Phosphatpuffer über 24 inkubiert wurden, annähernd die gleiche osmotische Resistenzkurve wie normale Erythrocyten aufweisen. Die Kurven der osmotischen Resistenz der Erythrocytenschatten belegen, daß nach der erfolgten Präparation im Hinblick auf die osmotische Resistenz keine einheitlichen Zellpopulationen vorliegen. In allen Untersuchungen erfolgte der Abfall der osmotischen Resistenz in Lösungen abnehmender Osmolarität stets in stufenweiser Form. Ein gewisser Anteil der Zellen zeigte schon bei Osmolaritäten, die schon gering unter den isoosmotischen Werten lagen, eine Hämolyse. Dabei muß diskutiert werden, ob es sich dabei um Zellen handelt, die nicht hinreichend wiederverschlossen waren. Bei Erythrocytenschatten, die bereits in Gegenwart von Glucose-Adenosin-Phosphatpuffer präpariert wurden, war dieses Phänomen nicht so ausgeprägt. Bei einem Anteil von unter 5% der Zellen wird daher angenommen, daß sie nicht hinreichend

verschlossen waren. Die gesteigerte osmotische Resistenz bei den so präparierten Zellen, die über 24 Stunden gelagert waren, legt die Annahme nahe, daß es während Lagerung zu einer verbesserten Abdichtung kommt. Die Tatsache, daß 60% der frisch präparierten und 70% der über 24 Stunden gelagerten Erythrocytenschatten gegenüber normalen Erythrocyten eine erhöhte osmotische Resistenz aufweisen, kann weder anhand der vorliegenden experimentellen Daten noch anhand der vorliegenden Literatur erklärt werden. Zu ähnlichen Ergebnissen kam jedoch auch eine andere Arbeitsgruppe mit bislang unveröffentlichten Ergebnissen (HUBBARD, persönliche Mitteilung 1981). Die osmotische Resistenz von Erythrocytenschatten, die lediglich in Glucose-Phosphatpuffer, also ohne Adenosin wurden, war erheblich vermindert und dies noch mehr ausgeprägt, wenn diese Zellen über 24 Stunden gelagert wurden. Es muß angenommen werden, daß diese letzteren Zellen aufgrund ihrer verminderten osmotischen Resistenz nach ihrer Reinjektion in den Kreislauf eine erheblich verminderte in vivo-Überlebenszeit aufweisen dürften. Die Anwendung des osmotischen Resistenztests als Parameter zur weiteren Beurteilung der Erythrocytenschatten und der unterschiedlichen Präparationsmodifikationen in vitro hat sich damit als äußerst wertvoll erwiesen, da diese Unterschiede mittels anderer Parameter bislang nicht aufgedeckt werden konnten. Darüberhinaus muß angenommen werden, daß durch vorherige Inkubation in Medium erniedrigter Osmolarität (z.B. 200 mosmol/l) der Anteil der Zellen erniedrigter osmotischer Resistenz zur Hämolyse gelangen und damit nur die Zellpopulation zur Reinjektion in den

Kreislauf gelangen, die eine normale oder sogar erhöhte osmotische Resistenz aufweisen und aufgrund dieser physikalischen Eigenschaften besser in vivo überleben. Es muß weiteren Untersuchungen in vivo vorbehalten bleiben, diese Möglichkeit experimentell zu prüfen.

Vorhergehende Untersuchungen haben erwiesen, daß die hier verwandte Methode zur Präparation von Trägererythrocyten zu Zellen führte, die im Zellinhalt, in den Transporteigenschaften und in der Morphologie normalen Erythrocyten gleichen. Die vorliegende Arbeit belegt, daß auch Glucoseaufnahme und der Abfall der zellulären ATP-Spiegel einschließlich der Möglichkeit, diese wieder in Normalbereiche zu bringen, bei Trägererythrocyten und normalen Erythrocyten identisch ist. Die Ergebnisse der osmotischen Resistenz lassen jedoch nicht den Schluß zu, daß Trägererythrocyten in allen Kriterien mit normalen Erythrocyten identisch sind. Weitere differenzierte Untersuchungen der hämatologischen Diagnostik sollten in vitro zur Anwendung kommen, damit die bestmögliche Präparationsmodifikation zur Herstellung von Trägererythrocyten in vitro gefunden wird.

Erythrocytenschatten ("ghosts") sind als biologisch abbaubare Trägersysteme für exogene Enzyme oder Chemotherapeutika verwendet worden. Die Verwendung einer Dialysemethode erlaubte die Präparation von Zellen, deren Zellinhalt, Membrantransporteigenschaften, Morphologie und Überlebenszeit in vivo normalen Erythrocyten ähnlich sind und daher als Trägererythrocyten bezeichnet werden. Tierversuche ergaben, daß die zellulären ATP-Spiegel neben anderen Faktoren wesentlich für die Überlebenszeit dieser Zellen sind. Daher wurde in vitro das Verhalten der ATP-Spiegel, die Glucoseaufnahme sowie die osmotische Resistenz der Zellen untersucht. Trägererythrocyten wurden mittels eines Dialyseverfahrens hergestellt. Glucoseaufnahme und der Abfall der zellulären ATP-Spiegel war bei Trägererythrocyten und bei normalen Erythrocyten von Menschen in allen Versuchen gleich. Die Glucoseaufnahme nahm mit steigenden extrazellulären Glucosekonzentrationen und steigender Temperatur zu und wurde durch Zusatz von Adenosin, Inosin und Adenin beeinflusst. Der Abfall der zellulären ATP-Spiegel erfolgte kontinuierlich und war abhängig von der Temperatur, der extrazellulären Glucosekonzentration sowie von Adenosin, Inosin und Adenin. Erniedrigte ATP-Spiegel in gelagerten Zellen konnten durch Inkubation in Adenosin-Puffer wieder in Normalbereiche gebracht werden. Im Gegensatz zur osmotischen Resistenz normaler Erythrocyten, die sehr steil verlief, war diese bei Trägererythrocyten stufenförmig. Abhängig von den Versuchsbedingungen war ein Teil dieser Zellen weniger, ein anderer Teil weitaus mehr resistent als normale Erythrocyten. Die Untersuchungen haben gezeigt, daß der Präparationsvorgang zu keiner nennenswerten Beeinträchtigung des zellulären Energiestoffwechsels führt. Dies ist sowohl für die Aufbewahrung in vitro als auch für die Überlebenszeit in vivo bedeutsam. Ob die selektive Verwendung vermehrt osmotisch resistenter Zellen von Vorteil für die Überlebenszeit sein kann, bedarf der Prüfung in vivo.

Der Tabellenteil gliedert sich in zwei Teile. Im ersten, direkt anschließenden Teil (Teil 1) werden die für die grafischen Abbildungen berechneten Tabellenwerte dargestellt. Diese Tabellen stellen Durchschnittswerte der durchgeführten Versuche dar und wurden aufgrund der im zweiten Tabellenteil (Teil 2) angeführten Werte der Einzelversuche mathematisch aufgearbeitet und auf einem Microcomputer (TRS-80 Modell 2, Betriebssystem CP/M, Programmiersprache BASIC-80) errechnet. Dabei wurden die Werte nach Bildung des Durchschnitts für den jeweiligen Versuch folgendermaßen umgerechnet: die vom Photometer (PERKIN-ELMER 5505 mit Microprozessor) erhaltenen Extinktionswerte wurden jeweils von mg% in micromol/l umgerechnet. Daraus wurden die stündliche Aufnahme und die Gesamtaufnahme von Glucose bzw. der ATP-Abfall errechnet, die im Tabellenteil 1 dargestellt sind und als Ausgangswerte für die Abbildungen verwendet wurden. Bei der Berechnung der Prozentwerte wurden die jeweiligen Ausgangswerte (0-Stunden-Wert) gleich 100% gesetzt und die weitere Glucoseaufnahme bzw. ATP-Abfall der Erythrocyten als prozentuale Differenz zum Ausgangswert ausgewiesen.

TABELLE ZUR ABBILDUNG 1.1

Durchschnittliche Glucoseaufnahme (in micromol/ml Zellen) von Erythrocyten (N) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (A) bzw. in Puffer E (E), während Inkubation bei 4 Grad C in 5 mM Glucose-Adenosin-Phosphatpuffer in Abhängigkeit von der Zeit.

Zeit (h)	(N)	(A)	(E)
0	0	0	0
1	0.10	0.10	0.08
2	0.18	0.17	0.15
3	0.30	0.25	0.20
24	0.58	0.52	0.50

TABELLE ZUR ABBILDUNG 1.2

Durchschnittliche Glucoseaufnahme (in % vom Ausgangswert) von Erythrocyten (N) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (A) bzw. in Puffer E (E), während Inkubation bei 4 Grad C in 5 mM Glucose-Adenosin-Phosphatpuffer in Abhängigkeit von der Zeit.

Zeit (h)	(N)	(A)	(E)
0	0 %	0 %	0 %
1	6	7	5
2	10	11	98
3	17	16	12
24	33	30	32

TABELLE ZUR ABBILDUNG 2.1

Durchschnittliche Glucoseaufnahme (in micromol/ml Zellen) von Erythrocyten (N) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (A) bzw. in Puffer E (E), während Inkubation bei 20 Grad C in 5 mM Glucose-Adenosin-Phosphatpuffer in Abhängigkeit von der Zeit.

Zeit (h)	(N)	(A)	(E)
0	0	0	0
1	0.12	0.08	0.08
2	0.27	0.15	0.30
3	0.33	0.37	0.43
24	0.60	0.62	0.48

TABELLE ZUR ABBILDUNG 2.2

Durchschnittliche Glucoseaufnahme (in % vom Ausgangswert) von Erythrocyten (N) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (A) bzw. in Puffer E (E), während Inkubation bei 20 Grad C in 5 mM Glucose-Adenosin-Phosphatpuffer in Abhängigkeit von der Zeit.

Zeit (h)	(N)	(A)	(E)
0	0 %	0 %	0 %
1	8	6	5
2	19	12	18
3	24	29	26
24	41	48	45

TABELLE ZUR ABBILDUNG 3.1

Durchschnittliche Glucoseaufnahme (in micromol/ml Zellen) von Erythrocyten (N) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (A) bzw. in Puffer E (E), während Inkubation bei 37 Grad C in 5 mM Glucose-Adenosin-Phosphatpuffer in Abhängigkeit von der Zeit.

Zeit (h)	(N)	(A)	(E)
0	0	0	0
1	0.18	0.18	0.17
2	0.35	0.35	0.32
3	0.53	0.55	0.48
24	0.92	0.85	0.85

TABELLE ZUR ABBILDUNG 3.2

Durchschnittliche Glucoseaufnahme (in % vom Ausgangswert) von Erythrocyten (N) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (A) bzw. in Puffer E (E), während Inkubation bei 37 Grad C in 5 mM Glucose-Adenosin-Phosphatpuffer in Abhängigkeit von der Zeit.

Zeit (h)	(N)	(A)	(E)
0	0 %	0 %	0 %
1	10	12	10
2	19	23	19
3	30	36	29
24	51	55	52

TABELLE ZUR ABBILDUNG 4.1

Durchschnittliche Glucoseaufnahme (in micromol/ml Zellen) von Erythrocyten (N) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (A) bzw. in Puffer E (E), während Inkubation bei 4 Grad C in 10 mM Glucose-Adenosin-Phosphatpuffer in Abhängigkeit von der Zeit.

Zeit (h)	(N)	(A)	(E)
0	0	0	0
1	0.12	0.13	0.13
2	0.25	0.28	0.23
3	0.39	0.37	0.33
24	0.95	0.85	0.97

TABELLE ZUR ABBILDUNG 4.2

Durchschnittliche Glucoseaufnahme (in % vom Ausgangswert) von Erythrocyten (N) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (A) bzw. in Puffer E (E), während Inkubation bei 4 Grad C in 10 mM Glucose-Adenosin-Phosphatpuffer in Abhängigkeit von der Zeit.

Zeit (h)	(N)	(A)	(E)
0	0 %	0 %	0 %
1	5	4	4
2	10	9	7
3	14	12	10
24	33	29	35

TABELLE ZUR ABBILDUNG 5.1

Durchschnittliche Glucoseaufnahme (in micromol/ml Zellen) von Erythrocyten (N) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (A) bzw. in Puffer E (E), während Inkubation bei 20 Grad C in 10 mM Glucose-Adenosin-Phosphatpuffer in Abhängigkeit von der Zeit.

Zeit (h)	(N)	(A)	(E)
0	0	0	0
1	0.18	0.23	0.13
2	0.42	0.55	0.33
3	0.65	0.78	0.60
24	1.30	1.32	1.28

TABELLE ZUR ABBILDUNG 5.2

Durchschnittliche Glucoseaufnahme (in % vom Ausgangswert) von Erythrocyten (N) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (A) bzw. in Puffer E (E), während Inkubation bei 20 Grad C in 10 mM Glucose-Adenosin-Phosphatpuffer in Abhängigkeit von der Zeit.

Zeit (h)	(N)	(A)	(E)
0	0 %	0 %	0 %
1	6	7	4
2	13	17	10
3	21	24	18
24	41	41	38

TABELLE ZUR ABBILDUNG 6.1

Durchschnittliche Glucoseaufnahme (in micromol/ml Zellen) von Erythrocyten (N) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (A) bzw. in Puffer E (E), während Inkubation bei 37 Grad C in 10 mM Glucose-Adenosin-Phosphatpuffer in Abhängigkeit von der Zeit.

Zeit (h)	(N)	(A)	(E)
0	0	0	0
1	0.43	0.44	0.38
2	0.83	0.82	0.72
3	1.18	1.28	1.08
24	1.65	1.82	1.67

TABELLE ZUR ABBILDUNG 6.2

Durchschnittliche Glucoseaufnahme (in % vom Ausgangswert) von Erythrocyten (N) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (A) bzw. in Puffer E (E), während Inkubation bei 37 Grad C in 10 mM Glucose-Adenosin-Phosphatpuffer in Abhängigkeit von der Zeit.

Zeit (h)	(N)	(A)	(E)
0	0 %	0 %	0 %
1	14	13	11
2	26	25	21
3	37	40	32
24	52	56	50

TABELLE 7a.1

Durchschnittliche Glucoseaufnahme (in micromol/ml Zellen) von Erythrocyten (N) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (A) bzw. in Puffer E (E), während Inkubation bei 4 Grad C in 20 mM Glucose-Adenosin-Phosphatpuffer in Abhängigkeit von der Zeit.

Zeit (h)	(N)	(A)	(E)
0	0	0	0
1	0.18	0.20	0.21
2	0.26	0.39	0.37
3	0.35	0.65	0.66
24	0.88	1.12	1.67

TABELLE ZUR ABBILDUNG 7a.2

Durchschnittliche Glucoseaufnahme (in % vom Ausgangswert) von Erythrocyten (N) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (A) bzw. in Puffer E (E), während Inkubation bei 4 Grad C in 20 mM Glucose-Adenosin-Phosphatpuffer in Abhängigkeit von der Zeit.

Zeit (h)	(N)	(A)	(E)
0	0 %	0 %	0 %
1	4	3	3
2	6	6	5
3	8	11	9
24	25	28	34

TABELLE ZUR ABBILDUNG 7.1

Durchschnittliche Glucoseaufnahme (in micromol/ml Zellen) von Erythrocyten (N) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (A) bzw. in Puffer E (E), während Inkubation bei 20 Grad C in 20 mM Glucose-Adenosin-Phosphatpuffer in Abhängigkeit von der Zeit.

Zeit (h)	(N)	(A)	(E)
0	0	0	0
1	0.20	0.23	0.23
2	0.33	0.52	0.43
3	0.43	0.77	0.65
24	0.93	1.68	3.07

TABELLE ZUR ABBILDUNG 7.2

Durchschnittliche Glucoseaufnahme (in % vom Ausgangswert) von Erythrocyten (N) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (A) bzw. in Puffer E (E), während Inkubation bei 20 Grad C in 20 mM Glucose-Adenosin-Phosphatpuffer in Abhängigkeit von der Zeit.

Zeit (h)	(N)	(A)	(E)
0	0 %	0 %	0 %
1	4	4	3
2	7	9	6
3	9	14	10
24	40	31	45

TABELLE ZUR ABBILDUNG 8.1

Durchschnittliche Glucoseaufnahme (in micromol/ml Zellen) von Erythrocyten (N) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (A) bzw. in Puffer E (E), während Inkubation bei 37 Grad C in 20 mM Glucose-Adenosin-Phosphatpuffer in Abhängigkeit von der Zeit.

Zeit (h)	(N)	(A)	(E)
0	0	0	0
1	0.37	0.43	0.43
2	0.67	0.80	0.78
3	0.92	1.20	1.15
24	2.30	2.77	3.38

TABELLE ZUR ABBILDUNG 8.2

Durchschnittliche Glucoseaufnahme (in % vom Ausgangswert) von Erythrocyten (N) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (A) bzw. in Puffer E (E), während Inkubation bei 37 Grad C in 20 mM Glucose-Adenosin-Phosphatpuffer in Abhängigkeit von der Zeit.

Zeit (h)	(N)	(A)	(E)
0	0 %	0 %	0 %
1	8	8	6
2	14	14	12
3	19	21	17
24	48	49	50

TABELLE ZUR ABBILDUNG 9.1

Durchschnittliche Glucoseaufnahme (in micromol/ml Zellen) von Erythrocyten (N) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (A) bzw. in Puffer E (E), während Inkubation bei 20 Grad C in 10 mM Adenine und in Abhängigkeit von der Zeit.

Zeit (h)	(N)	(A)	(E)
0	0	0	0
1	0.05	0.17	0.07
2	0.13	0.27	0.17
3	0.22	0.62	1.28
24	1.22	1.38	1.03

TABELLE ZUR ABBILDUNG 9.2

Durchschnittliche Glucoseaufnahme (in % vom Ausgangswert) von Erythrocyten (N) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (A) bzw. in Puffer E (E), während Inkubation bei 20 Grad C in 10 mM Adenine in Abhängigkeit von der Zeit.

Zeit (h)	(N)	(A)	(E)
0	0 %	0 %	0 %
1	2	6	2
2	5	10	6
3	8	22	11
24	44	39	39

TABELLE ZUR ABBILDUNG 10.1

Durchschnittliche Glucoseaufnahme (in micromol/ml Zellen) von Erythrocyten (N) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (A) bzw. in Puffer E (E), während Inkubation bei 37 Grad C in 10 mM in Adenine und in Abhängigkeit von der Zeit.

Zeit (h)	(N)	(A)	(E)
0	0	0	0
1	0.15	0.22	0.25
2	0.25	0.30	0.40
3	0.58	0.68	0.55
24	2.15	2.23	2.33

TABELLE ZUR ABBILDUNG 10.2

Durchschnittliche Glucoseaufnahme (in % vom Ausgangswert) von Erythrocyten (N) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (A) bzw. in Puffer E (E), während Inkubation bei 37 Grad C in 10 mM Adenine in Abhängigkeit von der Zeit.

Zeit (h)	(N)	(A)	(E)
0	0 %	0 %	0 %
1	5	8	9
2	9	11	15
3	21	25	19
24	78	81	87

TABELLE ZUR ABBILDUNG 11.1

Durchschnittliche Glucoseaufnahme (in micromol/ml Zellen) von Erythrocyten (N) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (A) bzw. in Puffer E (E), während Inkubation bei 20 Grad C in 10 mM in Adenosine und in Abhängigkeit von der Zeit.

Zeit (h)	(N)	(A)	(E)
0	0	0	0
1	0.75	0.70	0.93
2	1.05	0.93	1.25
3	1.25	1.20	1.48
24	2.25	1.93	2.27

TABELLE ZUR ABBILDUNG 11.2

Durchschnittliche Glucoseaufnahme (in % vom Ausgangswert) von Erythrocyten (N) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (A) bzw. in Puffer E (E), während Inkubation bei 20 Grad C in 10 mM Adenosine in Abhängigkeit von der Zeit.

Zeit (h)	(N)	(A)	(E)
0	0 %	0 %	0 %
1	22	24	27
2	31	32	37
3	37	41	44
24	67	66	67

TABELLE ZUR ABBILDUNG 12.1

Durchschnittliche Glucoseaufnahme (in micromol/ml Zellen) von Erythrocyten (N) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (A) bzw. in Puffer E (E), während Inkubation bei 37 Grad C in 10 mM in Adenosine und in Abhängigkeit von der Zeit.

Zeit (h)	(N)	(A)	(E)
0	0	0	0
1	1.02	0.77	1.03
2	1.38	1.12	1.53
3	1.75	1.47	1.90
24	2.58	2.07	2.47

TABELLE ZUR ABBILDUNG 12.2

Durchschnittliche Glucoseaufnahme (in % vom Ausgangswert) von Erythrocyten (N) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (A) bzw. in Puffer E (E), während Inkubation bei 37 Grad C in 10 mM Adenosine in Abhängigkeit von der Zeit.

Zeit (h)	(N)	(A)	(E)
0	0 %	0 %	0 %
1	30	26	30
2	41	38	45
3	52	50	56
24	77	70	73

TABELLE ZUR ABBILDUNG 13.1

Durchschnittliche Glucoseaufnahme (in micromol/ml Zellen) von Erythrocyten (N) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (A) bzw. in Puffer E (E), während Inkubation bei 20 Grad C in 10 mM Inosine in Abhängigkeit von der Zeit.

Zeit (h)	(N)	(A)	(E)
0	0	0	0
1	0.23	0.20	0.12
2	0.43	0.30	0.22
3	0.67	0.45	0.38
24	1.15	0.90	0.93

TABELLE ZUR ABBILDUNG 13.2

Durchschnittliche Glucoseaufnahme (in % vom Ausgangswert) von Erythrocyten (N) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (A) bzw. in Puffer E (E), während Inkubation bei 20 Grad C in 10 mM Inosine in Abhängigkeit von der Zeit.

Zeit (h)	(N)	(A)	(E)
0	0 %	0 %	0 %
1	8	8	4
2	15	12	85
3	23	18	14
24	40	35	34

TABELLE ZUR ABBILDUNG 14.1

Durchschnittliche Glucoseaufnahme (in micromol/ml Zellen) von Erythrocyten (N) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (A) bzw. in Puffer E (E), während Inkubation bei 37 Grad C in 10 mM Inosine in Abhängigkeit von der Zeit.

Zeit (h)	(N)	(A)	(E)
0	0	0	0
1	0.78	0.58	0.50
2	0.97	1.07	0.70
3	1.12	1.30	0.88
24	2.40	2.23	1.90

TABELLE ZUR ABBILDUNG 14.2

Durchschnittliche Glucoseaufnahme (in % vom Ausgangswert) von Erythrocyten (N) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (A) bzw. in Puffer E (E), während Inkubation bei 37 Grad C in 10 mM Inosine in Abhängigkeit von der Zeit.

Zeit (h)	(N)	(A)	(E)
0	0 %	0 %	0 %
1	27	23	19
2	33	42	26
3	39	51	31
24	83	87	71

TABELLE ZUR ABBILDUNG 15.1

Durchschnittlicher Abfall von ATP (in micromol/ml Zellen) von Erythrocyten (N) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (A) bzw. in Puffer E (E), während Inkubation bei 20 Grad C in 5 mM Glucose-Adenosin-Phosphatpuffer in Abhängigkeit von der Zeit.

Zeit (h)	(N)	(A)	(E)
0	0	0	0
1	0.05	0.20	0.03
2	0.17	0.27	0.18
3	0.25	0.33	0.27
24	0.32	0.38	0.43

TABELLE ZUR ABBILDUNG 15.2

Durchschnittlicher Abfall von ATP (in % vom Ausgangswert) von Erythrocyten (N) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (A) bzw. in Puffer E (E), während Inkubation bei 20 Grad C in 5 mM Glucose-Adenosin-Phosphatpuffer in Abhängigkeit von der Zeit.

Zeit (h)	(N)	(A)	(E)
0	0 %	0 %	0 %
1	9	33	5
2	29	44	28
3	43	56	41
24	54	64	67

TABELLE ZUR ABBILDUNG 16.1

Durchschnittlicher Abfall von ATP (in micromol/ml Zellen) von Erythrocyten (N) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (A) bzw. in Puffer E (E), während Inkubation bei 37 Grad C in 5 mM Glucose-Adenosin-Phosphatpuffer in Abhängigkeit von der Zeit.

Zeit (h)	(N)	(A)	(E)
0	0	0	0
1	0.13	0.26	0.17
2	0.30	0.35	0.5
3	0.40	0.43	0.29
24	0.50	0.52	0.45

TABELLE ZUR ABBILDUNG 16.2

Durchschnittlicher Abfall von ATP (in % vom Ausgangswert) von Erythrocyten (N) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (A) bzw. in Puffer E (E), während Inkubation bei 37 Grad C in 5 mM Glucose-Adenosin-Phosphatpuffer in Abhängigkeit von der Zeit.

Zeit (h)	(N)	(A)	(E)
0	0 %	0 %	0 %
1	23	46	27
2	51	57	41
3	60	70	51
24	86	84	73

TABELLE ZUR ABBILDUNG 17.1

Durchschnittlicher Abfall von ATP (in micromol/ml Zellen) von Erythrocyten (N) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (A) bzw. in Puffer E (E), während Inkubation bei 20 Grad C in 10 mM Glucose-Adenosin-Phosphatpuffer in Abhängigkeit von der Zeit.

Zeit (h)	(N)	(A)	(E)
0	0	0	0
1	0.03	0.03	0.05
2	0.07	0.08	0.13
3	0.12	0.13	0.18
24	0.37	0.38	0.50

TABELLE ZUR ABBILDUNG 17.2

Durchschnittlicher Abfall von ATP (in % vom Ausgangswert) von Erythrocyten (N) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (A) bzw. in Puffer E (E), während Inkubation bei 20 Grad C in 10 mM Glucose-Adenosin-Phosphatpuffer in Abhängigkeit von der Zeit.

Zeit (h)	(N)	(A)	(E)
0	0 %	0 %	0 %
1	7	7	10
2	14	18	26
3	25	29	35
24	79	82	97

TABELLE ZUR ABBILDUNG 18.1

Durchschnittlicher Abfall von ATP (in micromol/ml Zellen) von Erythrocyten (N) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (A) bzw. in Puffer E (E), während Inkubation bei 37 Grad C in 10 mM Glucose-Adenosin-Phosphatpuffer in Abhängigkeit von der Zeit.

Zeit (h)	(N)	(A)	(E)
0	0		
1	0.07	0.07	0.07
2	0.15	0.22	0.17
3	0.27	0.30	0.23
24	0.42	0.38	0.47

TABELLE ZUR ABBILDUNG 18.2

Durchschnittlicher Abfall von ATP (in % vom Ausgangswert) von Erythrocyten (N) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (A) bzw. in Puffer E (E), während Inkubation bei 37 Grad C in 10 mM Glucose-Adenosin-Phosphatpuffer in Abhängigkeit von der Zeit.

Zeit (h)	(N)	(A)	(E)
0	0 %	0 %	0 %
1	15	15	13
2	35	48	33
3	62	67	47
24	96	85	93

TABELLE ZUR ABBILDUNG 22

Osmotische Resistenz normaler Erythrocyten während 0 und 24 Stunden bei Inkubation von 37 Grad C in % der maximalen Hämolyse.

Inkubations- Lösung	Prozent der maximalen Hämolyse zum Zeitpunkt	
g% NaCl	0-Stunden	24-Stunden
0.9	0 %	0 %
0.85	0	0
0.8	0	0
0.75	0	0
0.7	1	1
0.65	1	1
0.6	1	1
0.55	1	1
0.5	1	2
0.45	1	5
0.4	5	8
0.35	83	74
0.3	94	97
0.25	96	99
0.2	98	100
0.1	100	100

TABELLE ZUR ABBILDUNG 23

Osmotische Resistenz von Trägererythrocyten in Puffer A während 0 und 24 Stunden bei Inkubation von 37 Grad C in % der maximalen Hämolyse.

Inkubations- Lösung	Prozent der maximalen Hämolyse zum Zeitpunkt	
g% NaCl	0-Stunden	24-Stunden
0.9	2	2
0.85	2	6
0.8	3	7
0.75	3	7
0.7	6	8
0.65	6	8
0.6	15	8
0.55	16	8
0.5	18	11
0.45	26	13
0.4	39	30
0.35	40	31
0.3	52	34
0.25	54	47
0.2	74	52
0.1	100	100

TABELLE ZUR ABBILDUNG 24

Osmotische Resistenz von Trägererythrocyten in Puffer E während 0 und 24 Stunden bei Inkubation von 37 Grad C in % der maximalen Hämolyse.

Inkubations- Prozent der maximalen Hämolyse
Lösung zum Zeitpunkt

g% NaCl	0-Stunden	24-Stunden
0.9	8 %	14 %
0.85	9	26
0.8	10	45
0.75	14	48
0.7	18	49
0.65	19	50
0.6	20	55
0.55	22	60
0.5	30	62
0.45	38	78
0.4	48	88
0.35	69	90
0.3	84	100
0.25	91	100
0.2	96	100
0.1	100	100

T A B E L L E N - T E I L 2

In diesem zweiten Tabellenteil sind die Einzelwerte der jeweiligen Versuchsdurchführung aufgeführt. Aus den hier angeführten Einzelwerten der Versuche wurden für jeden Versuch die Durchschnittswerte errechnet (wie im Tabellen-Teil 1 beschrieben). Die hier angeführten Werte sind in mg% angegeben. Aus der Tabellenanordnung sind die Molarität und das Inkubationsmedium, die Temperatur und die Einzelwerte zum Abnahmezeitpunkt 0, 1, 2, 3 und 24 Stunden ersichtlich. Dabei wurden Präparationen mit normalen Erythrocyten mit (N), Präparationen von Trägererythrocyten in Puffer A als (A) und mit Trägererythrocyten in Puffer E als (E) bezeichnet.

MOLARITÄT	PRÄPARA- TION	TEMPER- ATUR	STUNDEN				
			0	1	2	3	24
5 mM Glucose	N	4	106	100	95	88	71
5 mM Glucose	N	4	103	99	95	89	74
5 mM Glucose	N	4	98	94	90	81	61
5 mM Glucose	N	4	86	82	76	68	60
5 mM Glucose	N	4	100	96	92	86	70
5 mM Glucose	N	4	90	85	80	73	58
5 mM Glucose	A	4	92	86	82	77	61
5 mM Glucose	A	4	96	86	80	67	60
5 mM Glucose	A	4	104	95	86	80	67
5 mM Glucose	A	4	106	97	79	70	56
5 mM Glucose	A	4	90	83	70	60	44
5 mM Glucose	A	4	87	77	70	65	49

MOLARITÄT	PRÄPARA- TION	TEMPER- ATUR	STUNDEN				
			0	1	2	3	24
5 mM Glucose	E	4	99	94	90	87	69
5 mM Glucose	E	4	103	96	93	90	71
5 mM Glucose	E	4	103	94	88	82	70
5 mM Glucose	E	4	89	79	72	69	48
5 mM Glucose	E	4	92	85	80	75	60
5 mM Glucose	E	4	97	95	92	88	73
5 mM Glucose	N	20	84	77	68	64	43
5 mM Glucose	N	20	88	78	69	60	48
5 mM Glucose	N	20	97	92	79	73	56
5 mM Glucose	N	20	85	76	65	58	49
5 mM Glucose	N	20	106	97	89	83	66
5 mM Glucose	A	20	77	72	68	55	40
5 mM Glucose	A	20	89	84	81	65	52
5 mM Glucose	A	20	79	76	70	59	38
5 mM Glucose	A	20	100	95	92	71	56
5 mM Glucose	A	20	104	97	93	80	67
5 mM Glucose	A	20	82	80	73	68	76
5 mM Glucose	E	20	99	94	81	73	55
5 mM Glucose	E	20	106	99	90	80	57
5 mM Glucose	E	20	87	83	71	63	61
5 mM Glucose	E	20	85	91	81	75	49
5 mM Glucose	E	20	98	93	83	66	52
5 mM Glucose	N	37	108	97	87	76	53
5 mM Glucose	N	37	89	77	85	77	46
5 mM Glucose	N	37	92	93	91	78	43
5 mM Glucose	N	37	97	86	69	60	52
5 mM Glucose	N	37	97	73	64	52	40

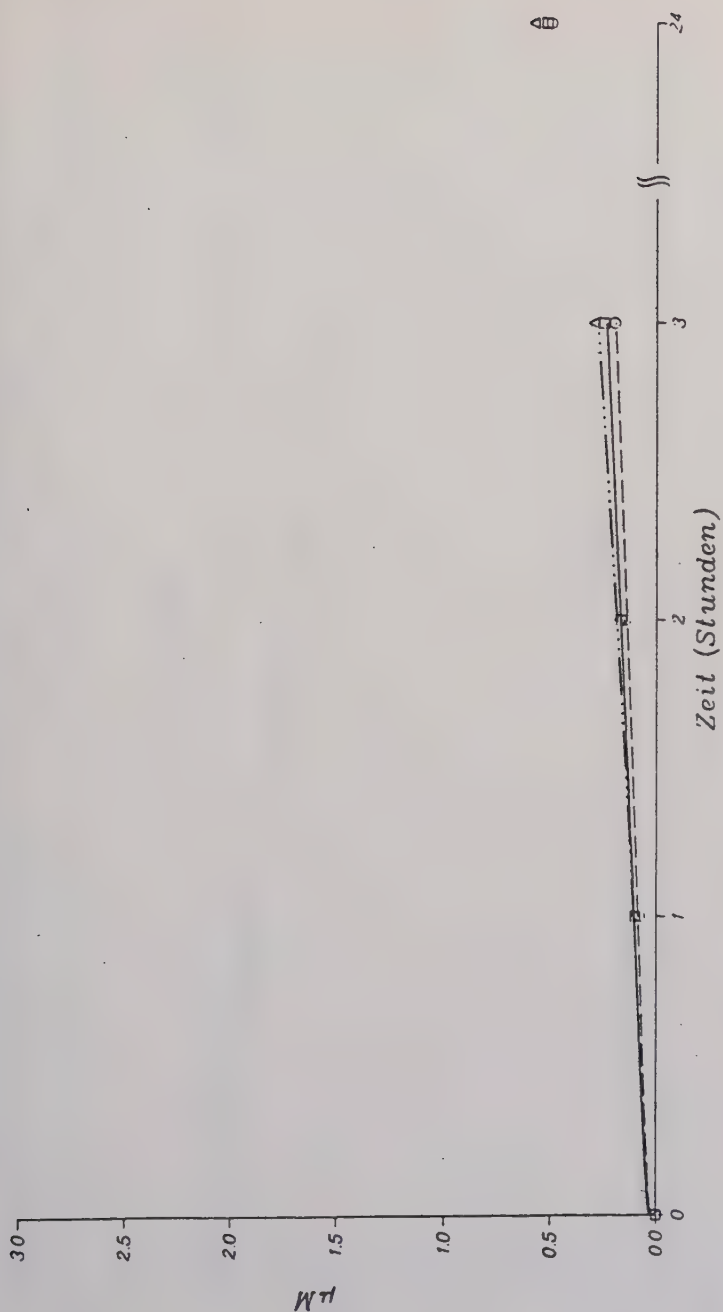
MOLARITÄT	PRÄPARA- TION	TEMPER- ATUR	STUNDEN				
			0	1	2	3	24
5 mM Glucose	N	37	96	92	70	60	45
5 mM Glucose	A	37	92	91	70	63	48
5 mM Glucose	A	37	107	95	82	65	51
5 mM Glucose	A	37	90	70	67	51	43
5 mM Glucose	A	37	37	71	59	51	41
5 mM Glucose	A	37	96	88	83	62	49
5 mM Glucose	A	37	95	84	70	69	42
5 mM Glucose	E	37	99	89	80	70	48
5 mM Glucose	E	37	114	96	83	71	44
5 mM Glucose	E	37	86	82	74	71	54
5 mM Glucose	E	37	100	95	90	83	62
5 mM Glucose	E	37	90	83	77	45	38
10 mM Glucose	N	4	185	180	177	174	156
10 mM Glucose	N	4	189	185	179	170	162
10 mM Glucose	A	4	185	181	178	175	160
10 mM Glucose	A	4	189	186	181	117	165
10 mM Glucose	E	4	185	181	179	173	165
10 mM Glucose	E	4	189	185	181	172	167
10 mM Glucose	N	20	189	180	163	140	114
10 mM Glucose	N	20	194	183	168	152	117
10 mM Glucose	N	20	178	172	156	137	105
10 mM Glucose	A	20	191	169	152	131	120
10 mM Glucose	A	20	194	180	161	147	115
10 mM Glucose	A	20	190	182	163	147	114
10 mM Glucose	A	20	202	178	165	154	118
10 mM Glucose	A	20	178	136	130	121	95
10 mM Glucose	E	20	201	193	181	165	124

MOLARITÄT	PRÄPARA- TION	TEMPER- ATUR	STUNDEN				
			0	1	2	3	24
10 mM Glucose	E	20	215	209	193	175	149
10 mM Glucose	E	20	178	170	163	137	109
10 mM Glucose	N	37	190	164	140	119	91
10 mM Glucose	N	37	189	147	138	116	80
10 mM Glucose	N	37	178	172	152	127	103
10 mM Glucose	N	37	192	156	138	120	88
10 mM Glucose	A	37	204	168	145	117	85
10 mM Glucose	A	37	205	168	149	109	91
10 mM Glucose	A	37	192	175	142	133	104
10 mM Glucose	A	37	162	142	136	107	92
10 mM Glucose	E	37	201	178	158	136	101
10 mM Glucose	E	37	178	161	147	117	96
10 mM Glucose	E	37	215	209	188	168	125
10 mM Glucose	E	37	210	197	154	128	105
20 mM Glucose	N	4	285	280	273	269	206
20 mM Glucose	N	4	292	283	279	273	212
20 mM Glucose	A	4	298	289	280	273	226
20 mM Glucose	A	4	305	299	292	285	233
20 mM Glucose	E	4	302	293	281	275	238
20 mM Glucose	E	4	318	311	302	294	247
20 mM Glucose	N	20	272	266	260	245	201
20 mM Glucose	N	20	290	278	270	264	174
20 mM Glucose	A	20	331	317	300	285	230
20 mM Glucose	A	20	336	325	313	300	200
20 mM Glucose	E	20	404	390	378	365	220
20 mM Glucose	E	20	367	349	332	318	308
20 mM Glucose	N	37	290	268	250	235	152

MOLARITÄT	PRÄPARA- TION	TEMPER- ATUR	STUNDEN				
			0	1	2	3	24
20 mM Glucose	N	37	272	257	238	209	143
20 mM Glucose	A	37	336	310	288	264	170
20 mM Glucose	A	37	367	355	340	312	198
20 mM Glucose	E	37	404	378	357	335	201
20 mM Glucose	E	37	367	345	328	308	189
10 mM Adenine	E	20	160	156	150	143	98
10 mM Adenine	E	20	165	162	157	152	91
10 mM Adenine	E	37	160	145	136	130	20
10 mM Adenine	E	37	167	152	128	112	24
10 mM Adenine	N	20	165	162	157	152	92
10 mM Adenine	N	20	170	165	159	145	88
10 mM Adenine	N	37	165	156	150	130	36
10 mM Adenine	N	37	172	162	156	141	47
10 mM Adenine	A	37	165	152	147	124	31
10 mM Adenine	A	37	174	166	154	129	38
10 mM Adenine	A	20	165	163	158	154	96
10 mM Adenine	A	20	170	166	160	148	95
10 mM Adenosin	A	20	176	134	120	104	60
10 mM Adenosin	A	20	174	130	118	102	64
10 mM Adenosin	A	37	176	130	109	88	52
10 mM Adenosin	A	37	169	128	106	82	50
10 mM Adenosin	E	20	204	148	129	115	68
10 mM Adenosin	E	20	188	140	120	108	65
10 mM Adenosin	E	37	204	142	112	90	56
10 mM Adenosin	E	37	198	140	106	87	52
10 mM Adenosin	N	20	201	156	138	126	66
10 mM Adenosin	N	20	198	153	134	120	61

MOLARITÄT	PRÄPARA- TION	TEMPER- ATUR	STUNDEN				
			0	1	2	3	24
10 mM Adenosin	N	37	201	140	118	96	46
10 mM Adenosin	N	37	197	138	115	91	42
10 mM Inosin	A	20	154	142	136	127	100
10 mM Inosin	A	20	166	150	127	130	105
10 mM Inosin	A	37	154	119	90	76	20
10 mM Inosin	A	37	168	123	97	81	22
10 mM Inosin	E	20	160	153	147	137	105
10 mM Inosin	E	20	158	150	142	135	102
10 mM Inosin	E	37	160	130	118	110	46
10 mM Inosin	E	37	156	131	117	111	44
10 mM Inosin	N	20	174	160	148	134	105
10 mM Inosin	N	20	165	161	152	139	113
10 mM Inosin	N	37	174	127	116	107	30
10 mM Inosin	N	37	181	131	122	119	33
5 mM ATP	A	20	36	24	20	16	13
5 mM ATP	A	20	38	22	20	15	11
5 mM ATP	A	20	35	26	21	18	13
5 mM ATP	A	37	37	20	16	11	6
5 mM ATP	A	37	39	21	76	12	7
5 mM ATP	A	37	37	21	16	12	6
5 mM ATP	E	20	39	37	28	23	13
5 mM ATP	E	20	36	33	27	22	11
5 mM ATP	E	20	37	33	26	23	11
5 mM ATP	E	37	37	27	22	20	10
5 mM ATP	E	37	39	26	21	18	9
5 mM ATP	E	37	39	25	20	19	8
5 mM ATP	N	20	35	32	25	20	16

MOLARITÄT	PRÄPARA- TION	TEMPER- ATUR	STUNDEN				
			0	1	2	3	24
5 ml ATP	N	20	39	35	27	25	18
5 mM ATP	N	20	37	32	26	21	16
5 mM ATP	N	37	35	27	17	14	5
5 mM ATP	N	37	39	29	20	15	4
10 mM ATP	A	37	27	23	14	9	4
10 mM ATP	A	37	31	25	17	11	3
10 mM ATP	E	20	22	19	14	11	6
10 mM ATP	E	20	31	28	23	20	7
10 mM ATP	E	37	30	26	20	16	2
10 mM ATP	E	37	32	27	23	18	1
10 mM ATP	A	20	28	26	23	20	5
10 mM ATP	N	20	28	26	24	21	6
10 mM ATP	N	20	28	26	24	21	6
10 mM ATP	N	37	26	22	17	10	1
10 mM ATP	N	37	26	22	17	10	1



Durchschnittliche Glucoseaufnahme in $\mu\text{M}/\text{ml}$ Zellen von Erythrocyten (Δ) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A ($\square$) bzw. Puffer E ($\circ$), während Inkubation bei 4°C in 5 mM Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer in Abhängigkeit von der Zeit.

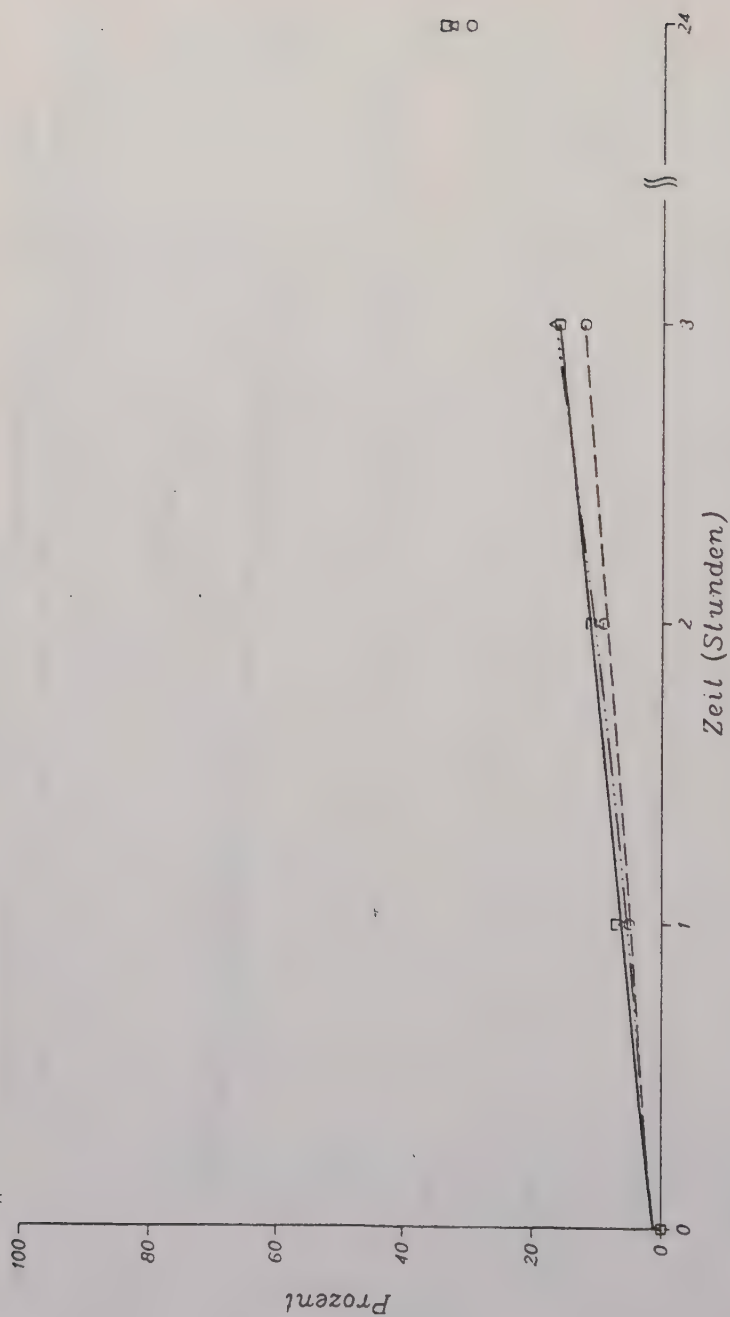
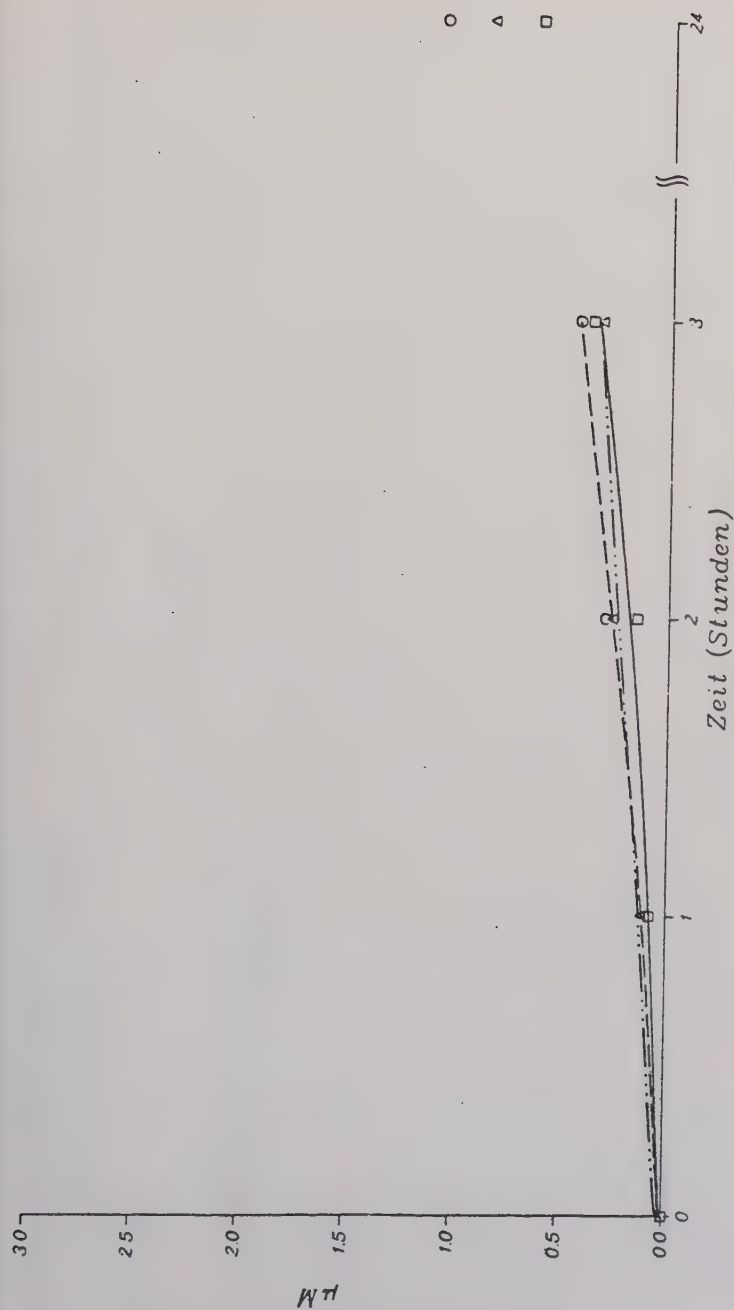
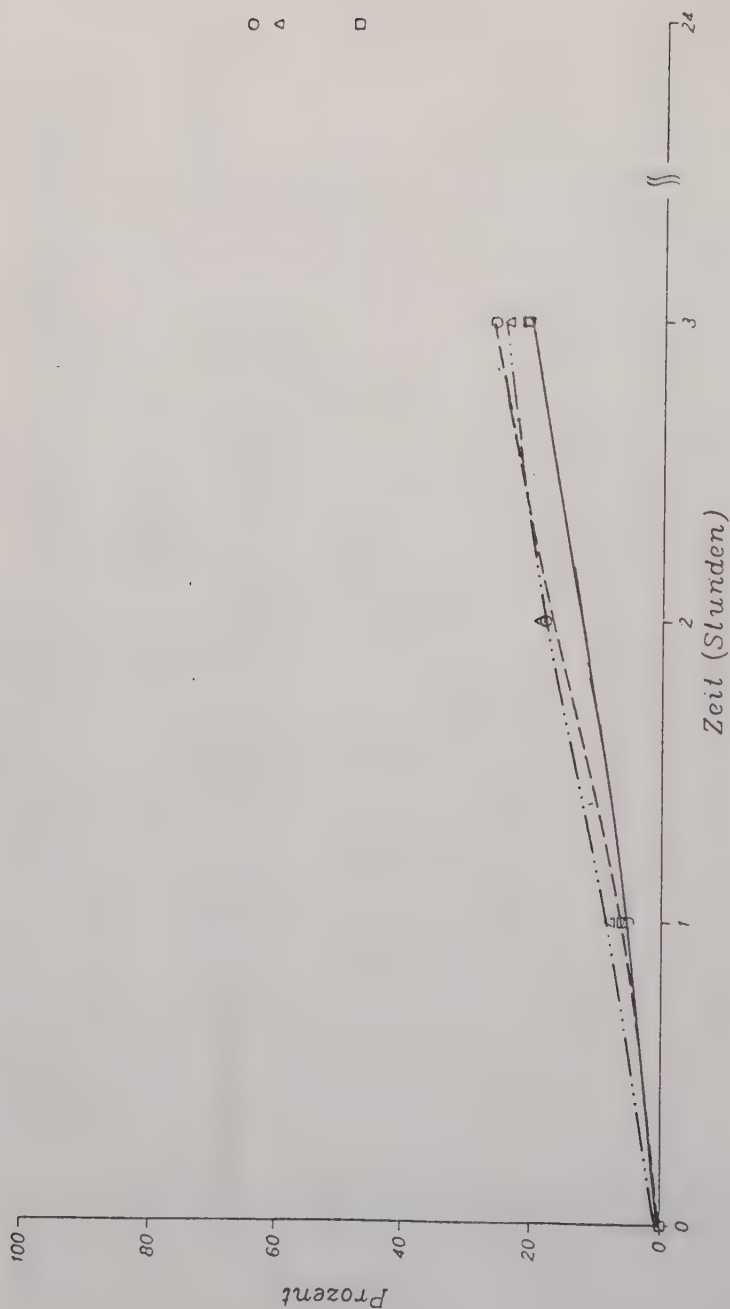


Abb. 1.2

Durchschnittliche Glucoseaufnahme in % vom Ausgangswert von Erythrocyten (Δ) und Trägerserythrocyten, präpariert in Puffer A (□) bzw. Puffer E (○), während Inkubation bei 4 °C in 5 mM Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer in Abhängigkeit von der Zeit.

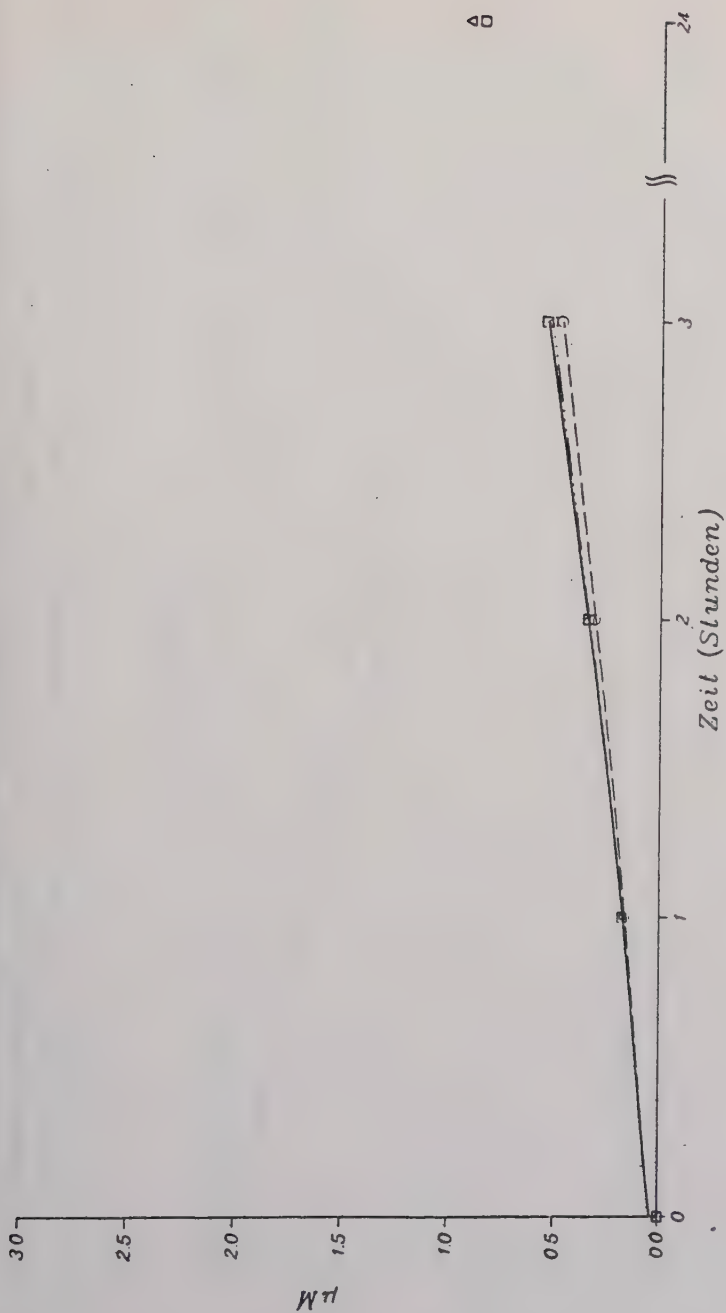


Durchschnittliche Glucoseaufnahme in $\mu\text{M/ml}$ Zellen von Erythrocyten (Δ) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A ($\square$) bzw. Puffer E ($\circ$), während Inkubation bei 20°C in 5 mM Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer in Abhängigkeit von der Zeit.



Durchschnittliche Glucoseaufnahme in % vom Ausgangswert von Erythrocyten (△) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (□) bzw. Puffer E (○), während Inkubation bei 20°C in 5 mM Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer in Abhängigkeit von der Zeit.

Abb. 2.2



Δ

Durchschnittliche Glucoseaufnahme in $\mu\text{M}/\text{ml}$ Zellen von Erythrocyten (Δ) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A ($\square$) bzw. Puffer E ($\circ$), während Inkubation bei 37°C in 5 mM Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer in Abhängigkeit von der Zeit.

Abb. 31

100

80

60

40

20

0

Prozent

Zeit (Stunden)

24

3

2

1

0

□ 3

□

□

○

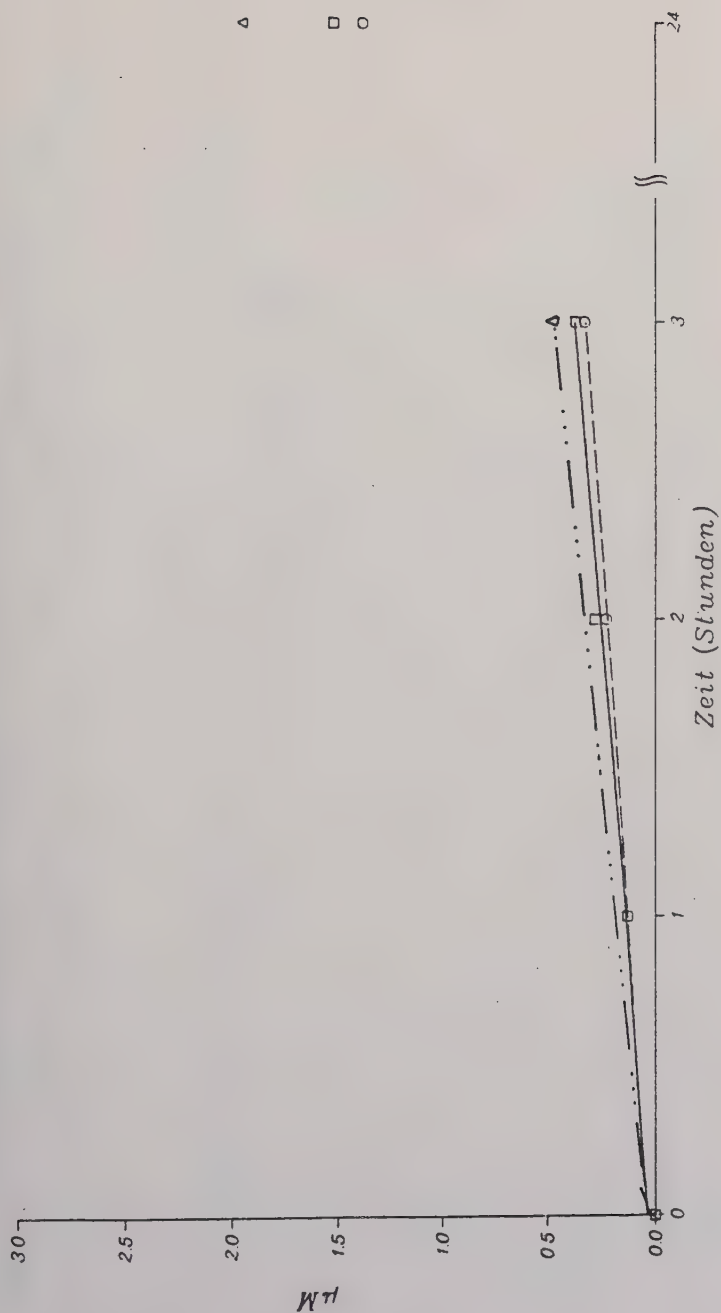
○

○

○

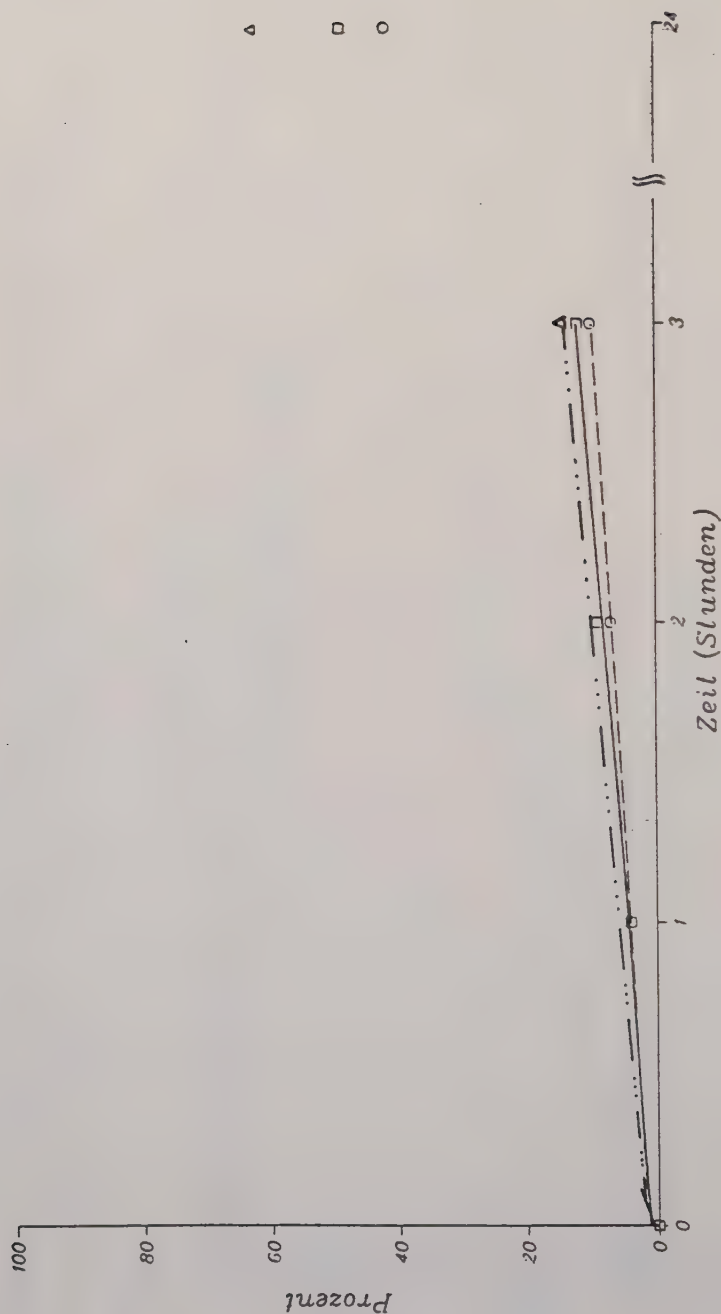
Durchschnittliche Glucoseaufnahme in % vom Ausgangswert von Erythrocyten (Δ) und Trägere-
throcysten, präpariert in Puffer A ($\square$) bzw. Puffer E ($\circ$), während Inkubation bei 37°C in
5 mM Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer in Abhängigkeit von der Zeit.

Abb. 3.2



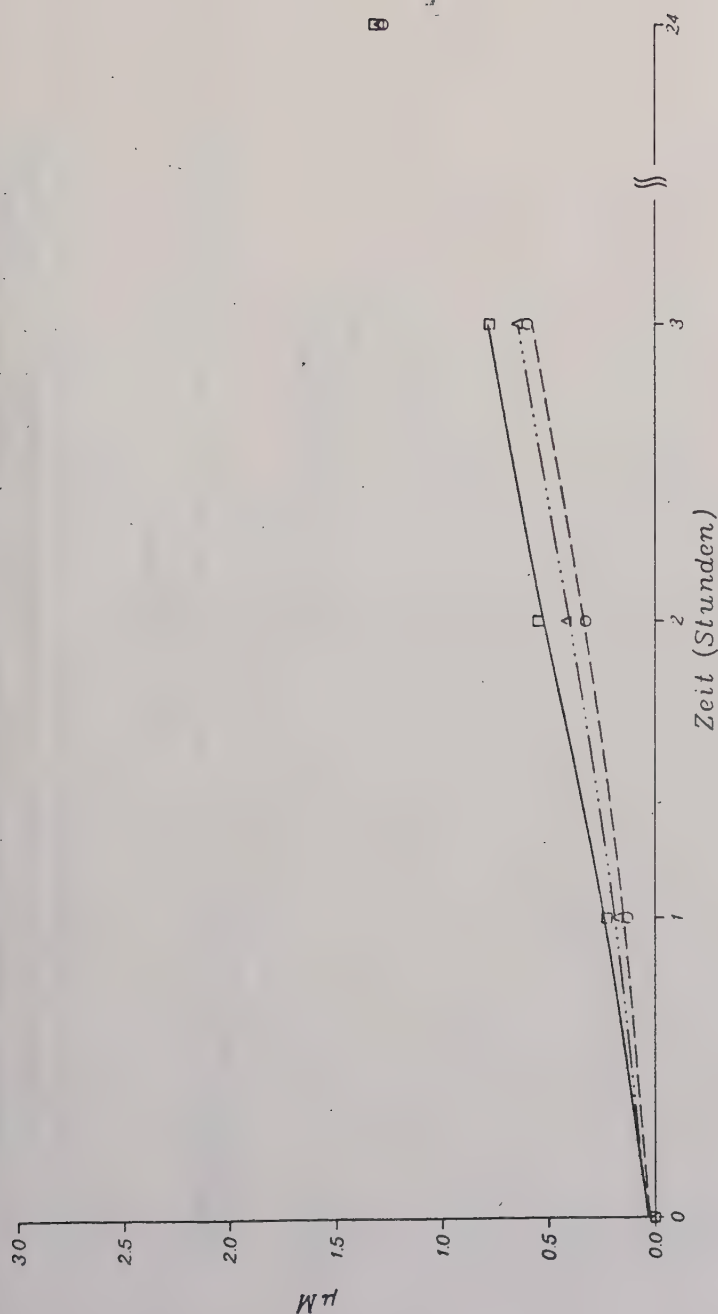
Durchschnittliche Glucoseaufnahme in $\mu\text{M/ml}$ Zellen von Erythrocyten (Δ) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A ($\square$) bzw. Puffer E ($\circ$), während Inkubation bei 4°C in 10mM Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer in Abhängigkeit von der Zeit.

Abb. 41



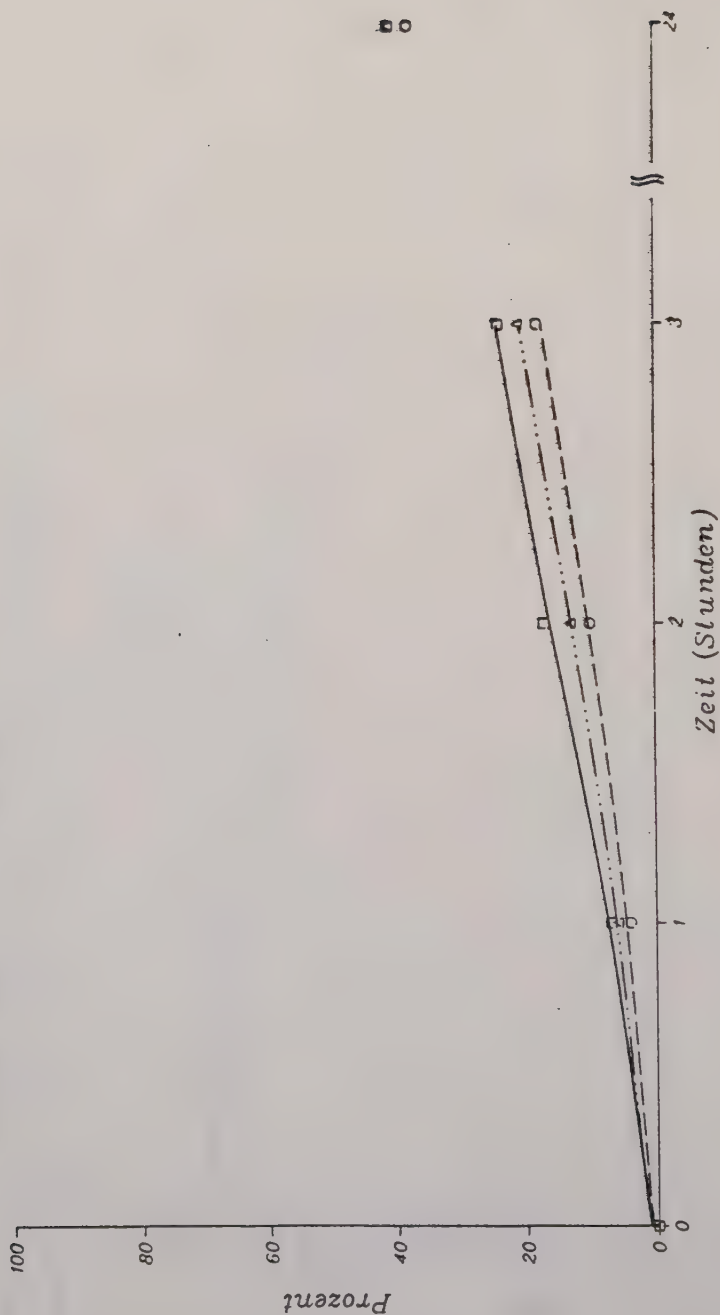
Durchschnittliche Glucoseaufnahme in X vom Ausgangswert von Erythrocyten (Δ) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (□) bzw. Puffer E (○), während Inkubation bei 4 °C in 10 mM Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer in Abhängigkeit von der Zeit.

Abb. 4.2

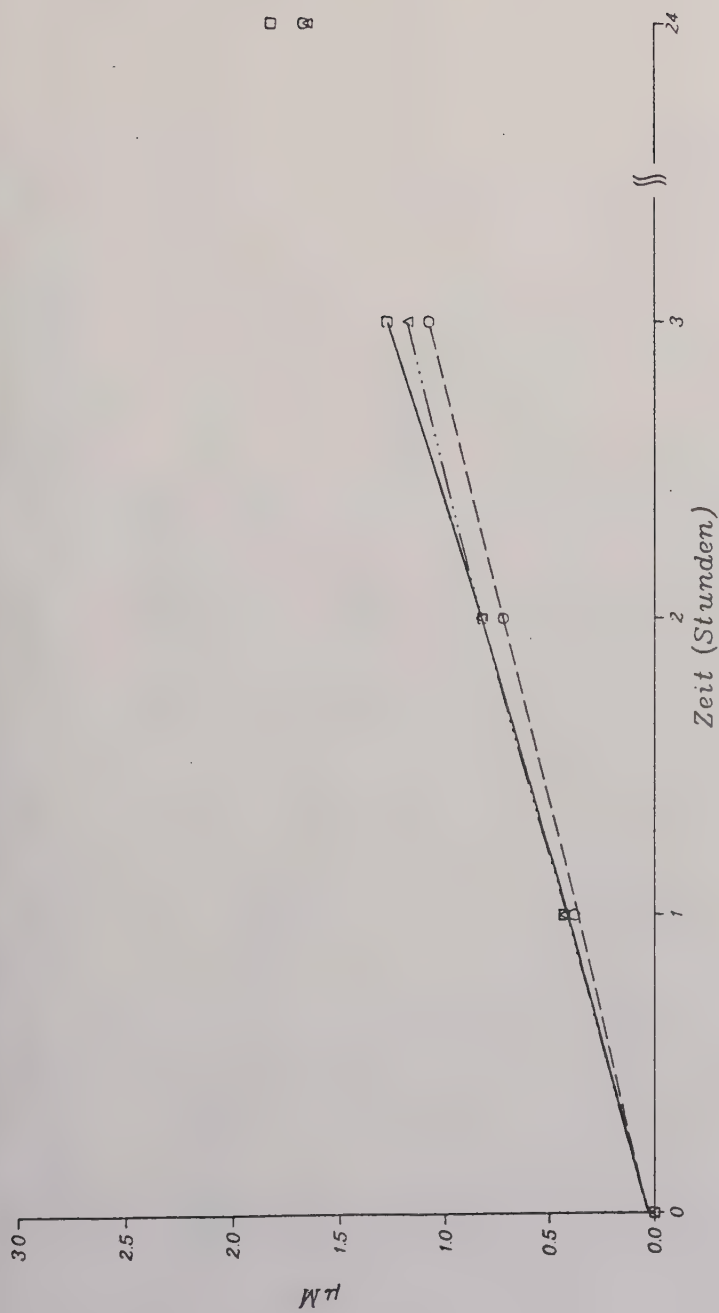


Durchschnittliche Glucoseaufnahme in $\mu\text{M}/\text{ml}$ Zellen von Erythrocyten (Δ) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A ($\square$) bzw. Puffer E ($\circ$), während Inkubation bei 20°C in 10mM Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer in Abhängigkeit von der Zeit.

Abb. 5.1

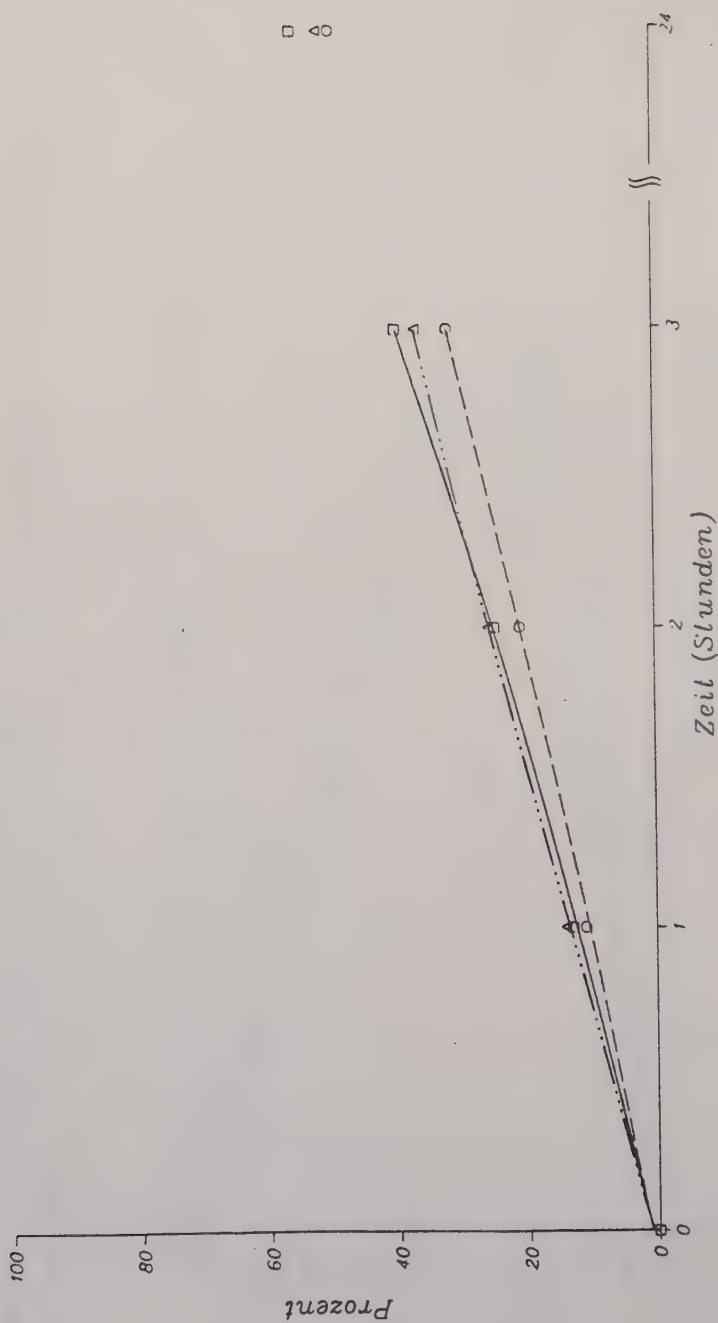


Durchschnittliche Glucoseaufnahme in % vom Ausgangswert von Erythrocyten (Δ) und Trägeterythrocyten, präpariert in Puffer A ($\square$) bzw. Puffer E ($\circ$), während Inkubation bei 20°C in 10 mM Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer in Abhängigkeit von der Zeit.

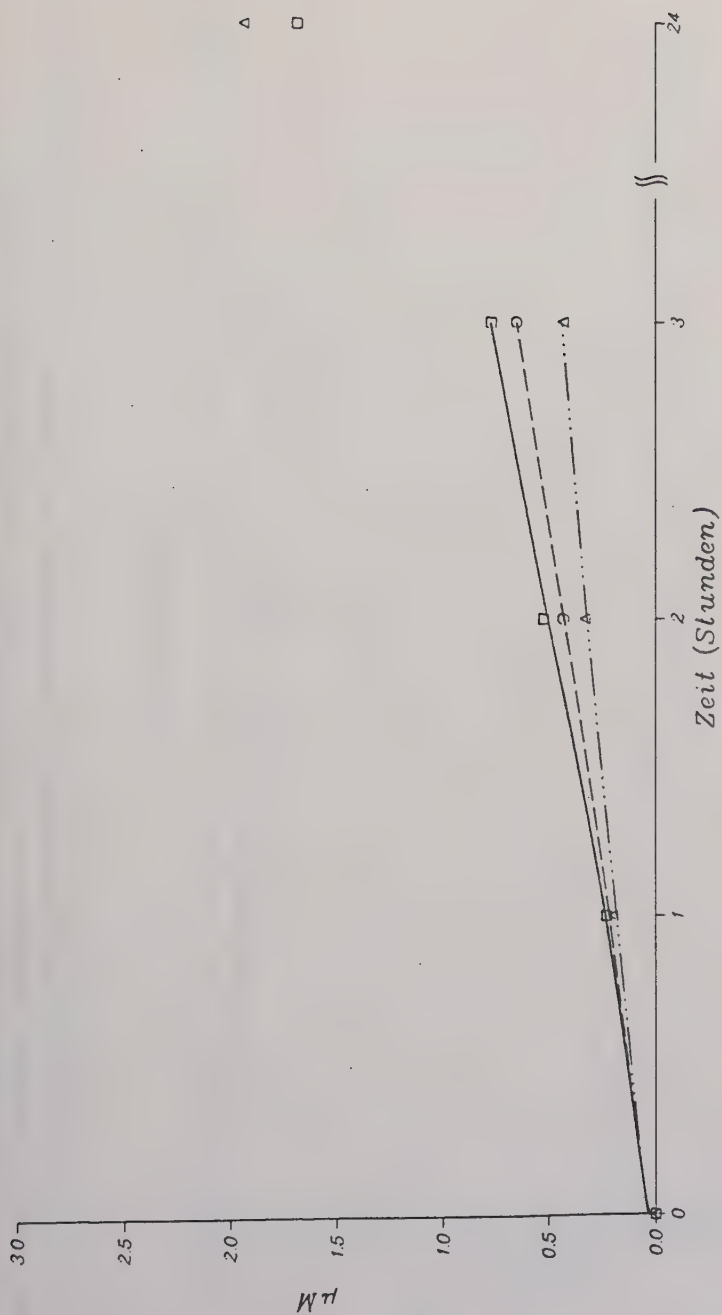


Durchschnittliche Glucoseaufnahme in $\mu\text{M/ml}$ Zellen von Erythrocyten (Δ) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A ($\square$) bzw. Puffer E ($\circ$), während Inkubation bei 37°C in 10mM Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer in Abhängigkeit von der Zeit.

Abb. 6.1

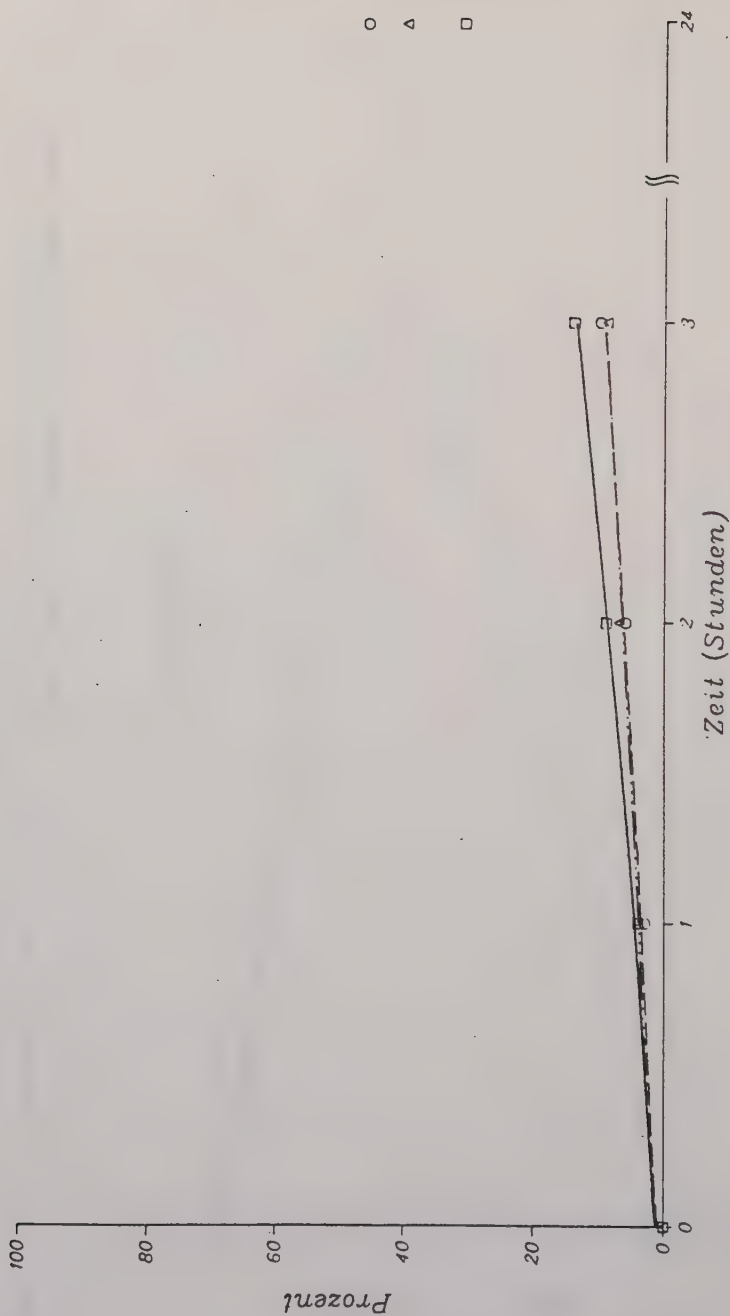


Durchschnittliche Glucoseaufnahme in % vom Ausgangswert von Erythrocyten (△) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (□) bzw. Puffer E (○), während Inkubation bei 37°C in 10 mM Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer in Abhängigkeit von der Zeit.

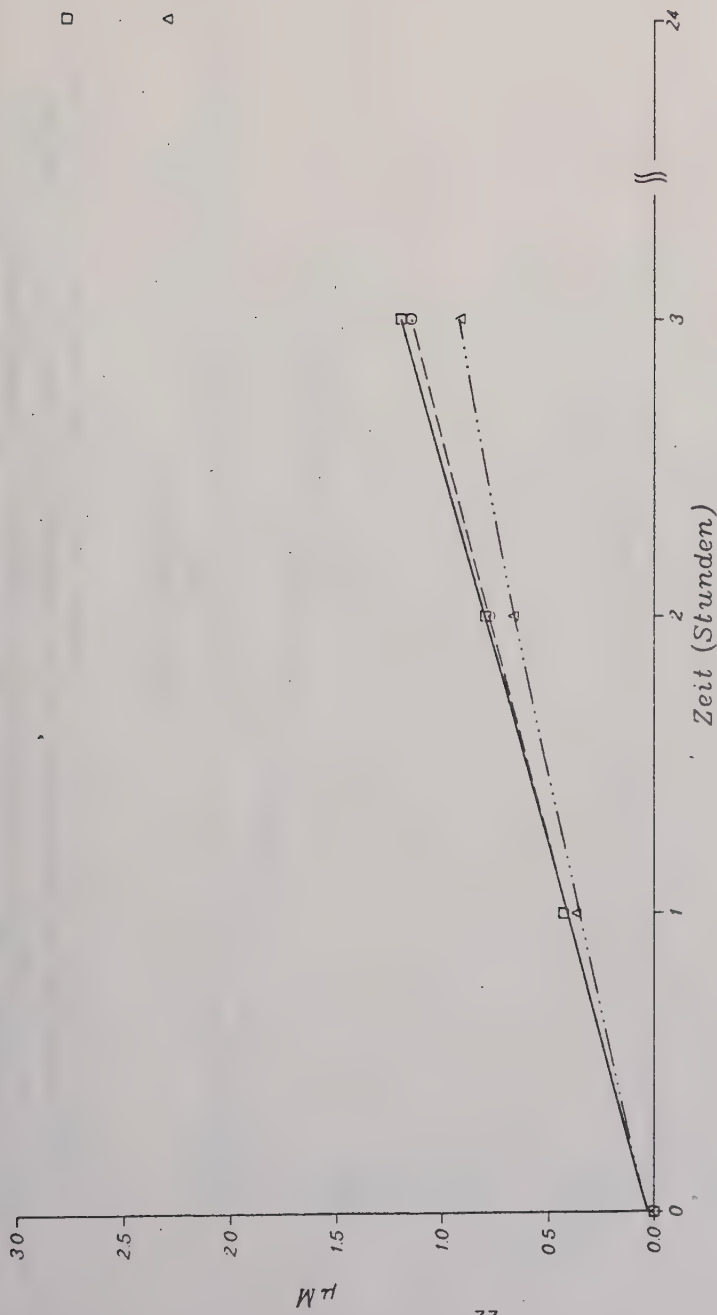


Durchschnittliche Glucoseaufnahme in $\mu M/ml$ Zellen von Erythrocyten ($\triangle$) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A ($\square$) bzw. Puffer E ($\circ$), während Inkubation bei $20^\circ C$ in $20 mM$ Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer in Abhängigkeit von der Zeit.

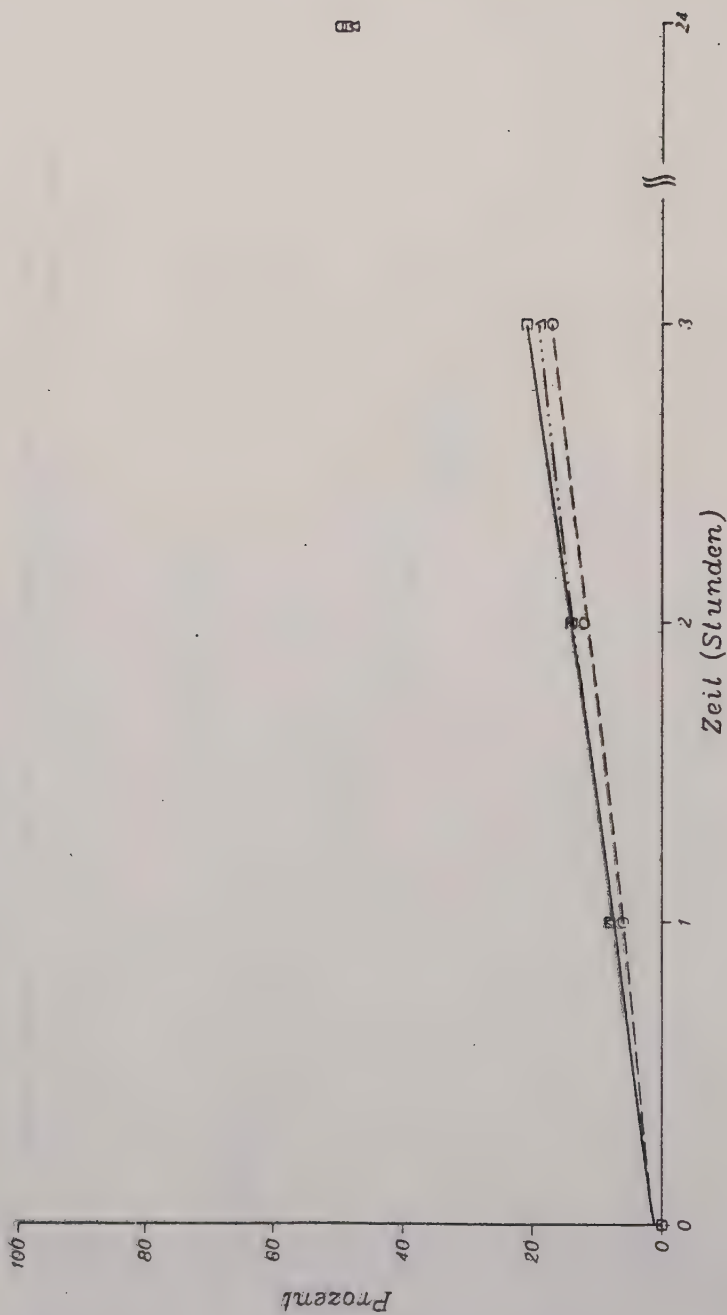
Abb. 7.1



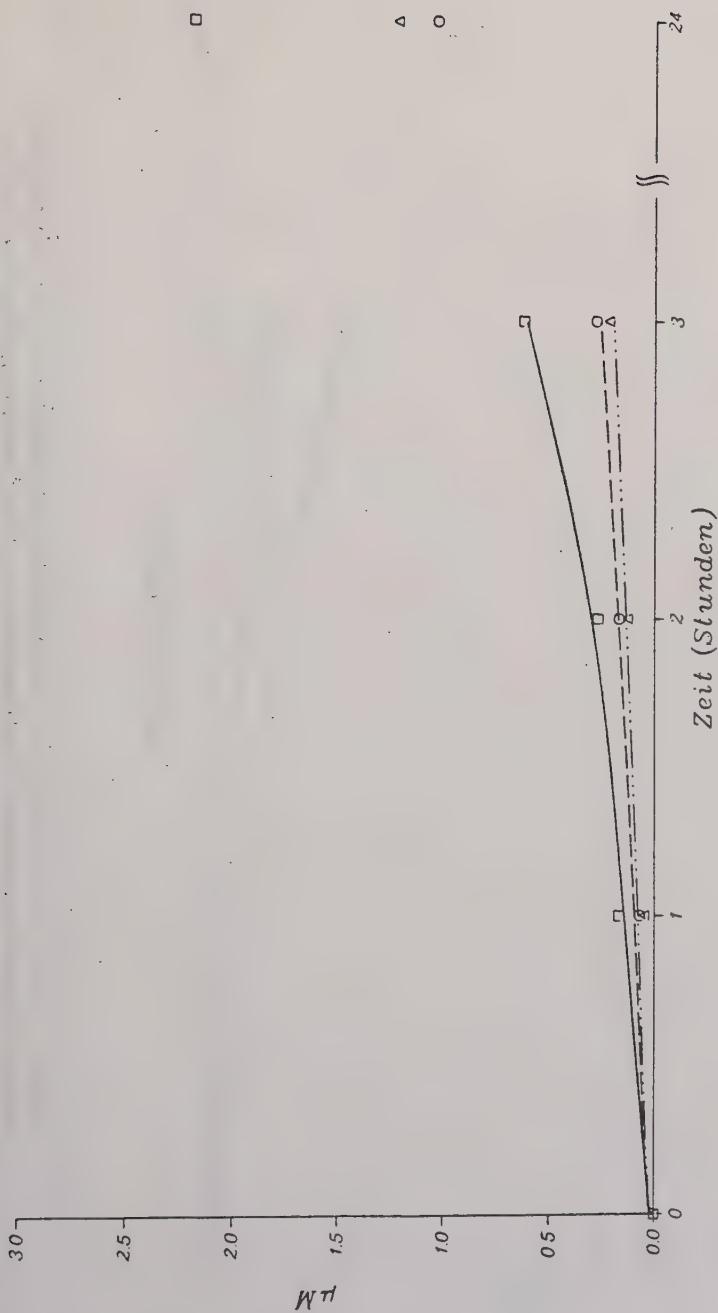
Durchschnittliche Glucoseaufnahme in % vom Ausgangswert von Erythrocyten (△) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (□) bzw. Puffer E (○), während Inkubation bei 20°C in 20 mM Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer in Abhängigkeit von der Zeit.



Durchschnittliche Glucoseaufnahme in $\mu\text{M}/\text{ml}$ Zellen von Erythrocyten (Δ) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A ($\square$) bzw. Puffer E ($\circ$), während Inkubation bei 37°C in 20mM Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer in Abhängigkeit von der Zeit.

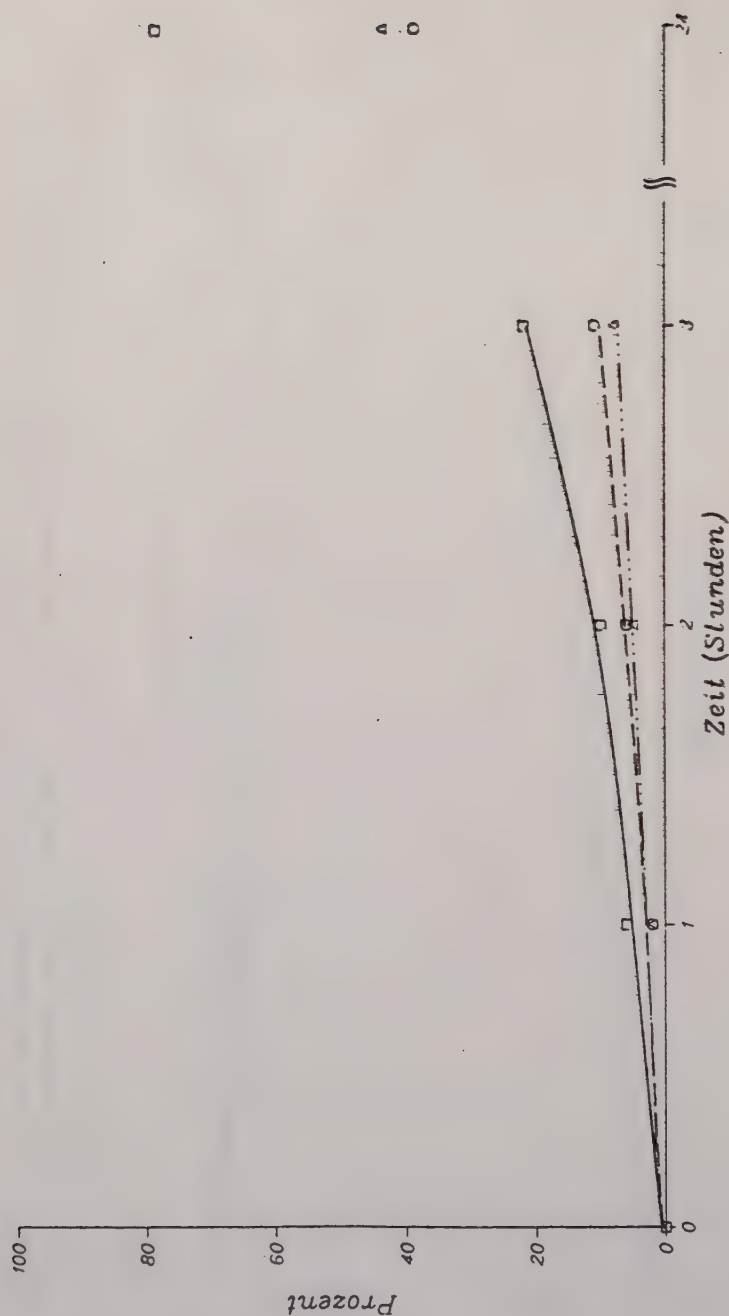


Durchschnittliche Glucoseaufnahme in % vom Ausgangswert von Erythrocyten (Δ) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A ($\square$) bzw. Puffer E ($\circ$), während Inkubation bei 37°C in 20 mM Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer in Abhängigkeit von der Zeit.



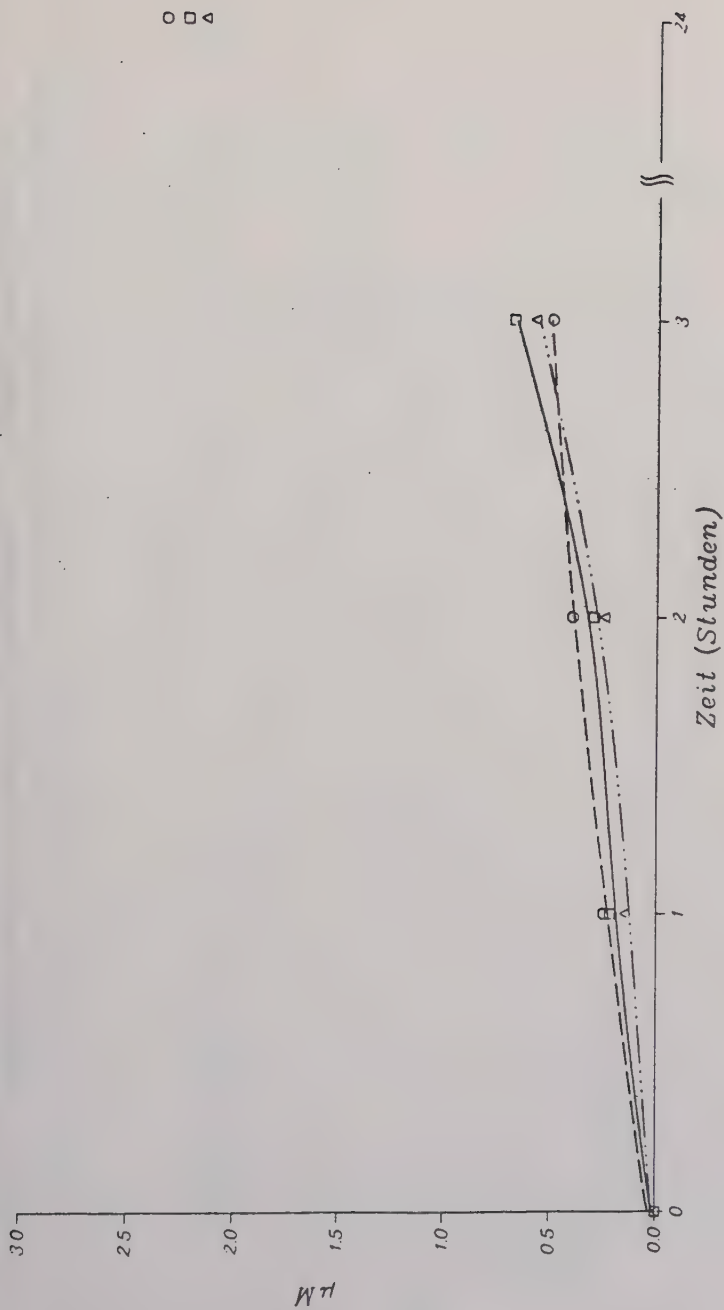
Durchschnittliche Glucoseaufnahme in $\mu M/ml$ Zellen von Erythrocyten (Δ) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A ($\square$) bzw. Puffer E ($\circ$), während Inkubation bei $20^{\circ}C$ in $10mM$ Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer und in Adenine in Abhängigkeit von der Zeit.

Abb. 9.1



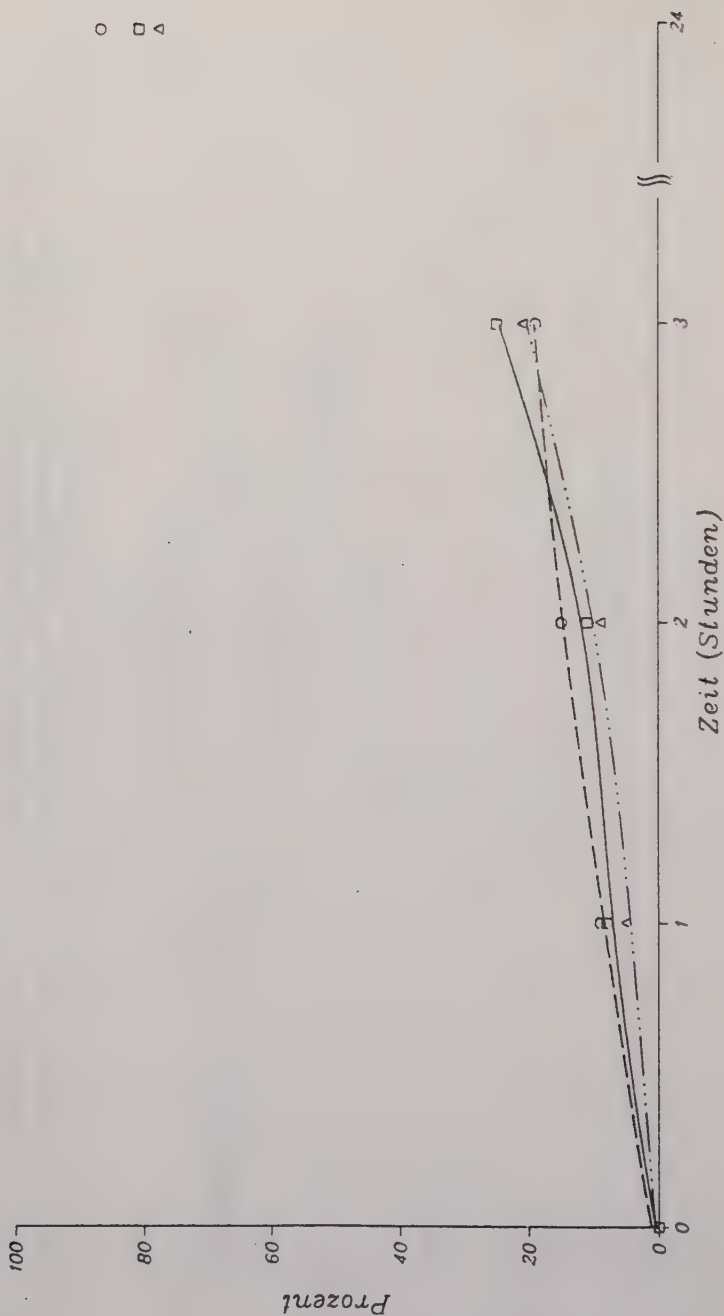
Durchschnittliche Glucoseaufnahme in % vom Ausgangswert von Erythrocyten (Δ) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A ($\square$) bzw. Puffer E ($\circ$), während Inkubation bei 20°C in 10 mM Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer und in Adenine in Abhängigkeit von der Zeit.

Abb. 9.2

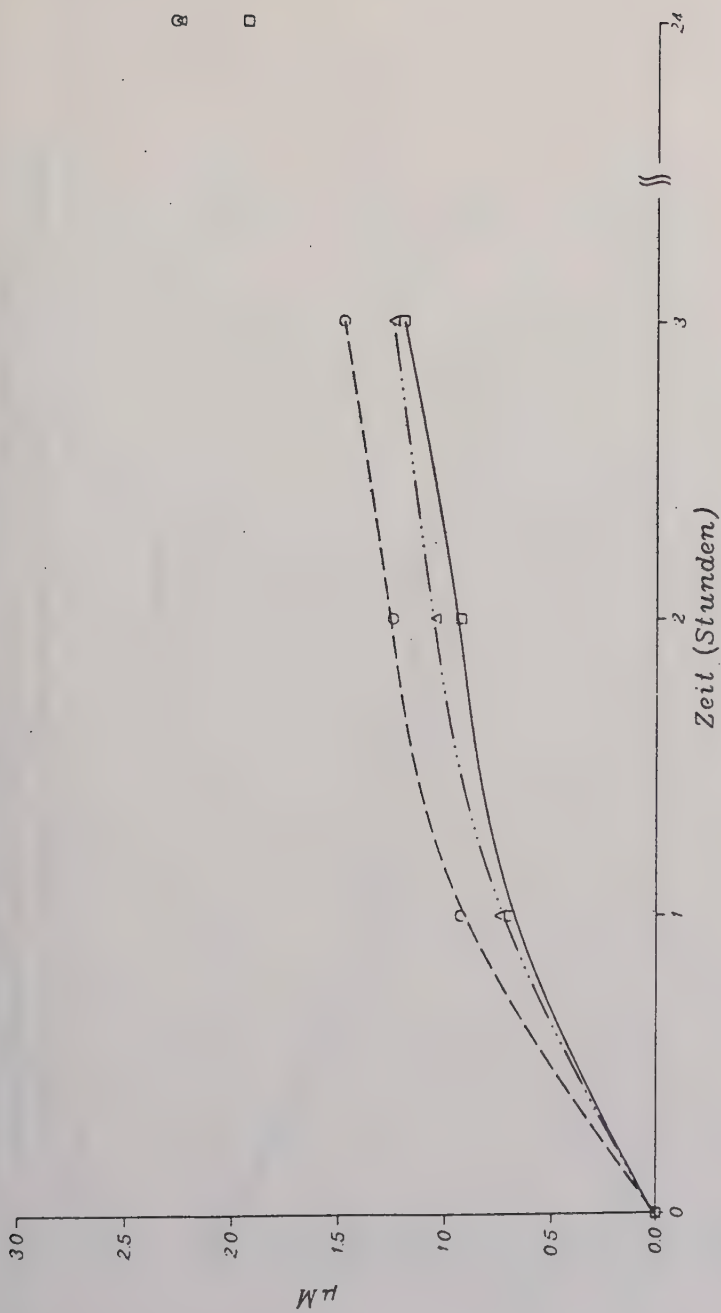


Durchschnittliche Glucoseaufnahme in $\mu\text{M/ml}$ Zellen von Erythrocyten (Δ) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A ($\square$) bzw. Puffer E ($\circ$), während Inkubation bei 37°C in 10mM Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer und in Adenine in Abhängigkeit von der Zeit.

Abb. 10.1

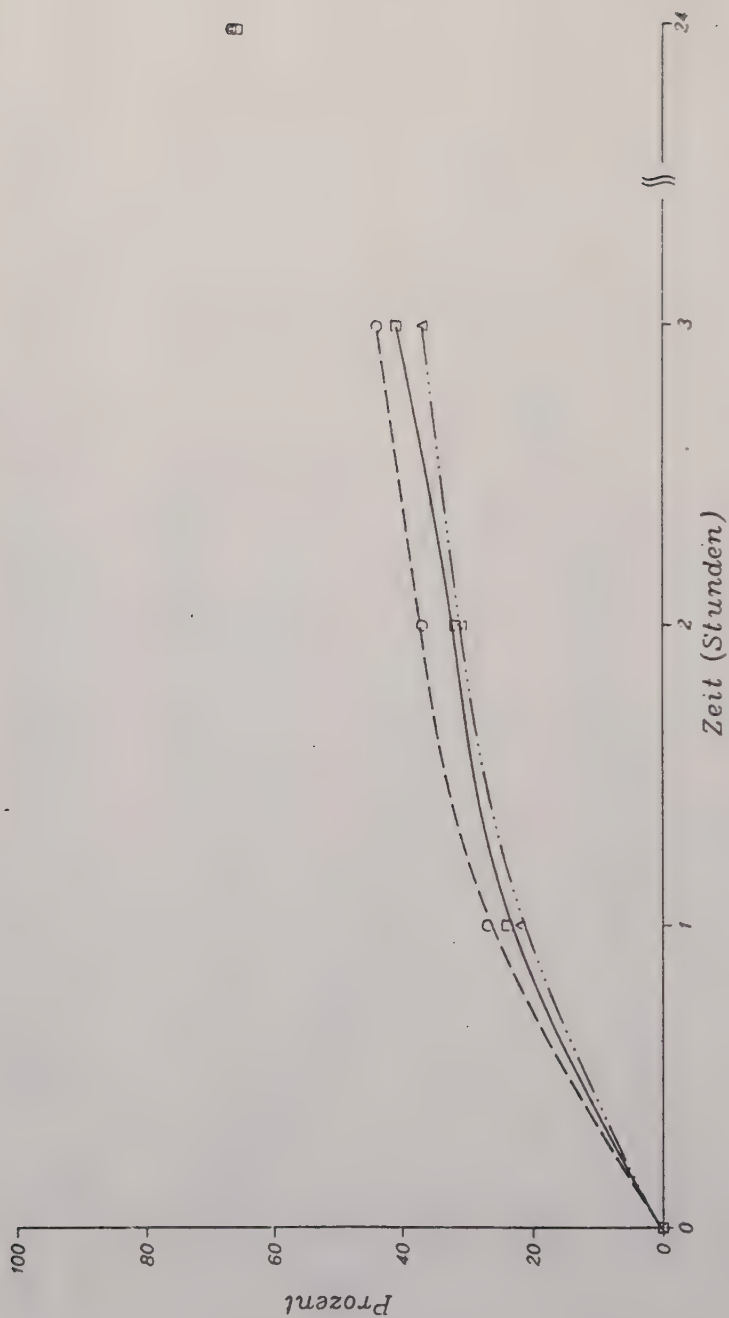


Durchschnittliche Glucoseaufnahme in % vom Ausgangswert von Erythrocyten (△) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (□) bzw. Puffer E (○), während Inkubation bei 37°C in 10 mM Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer und in Adenine in Abhängigkeit von der Zeit.



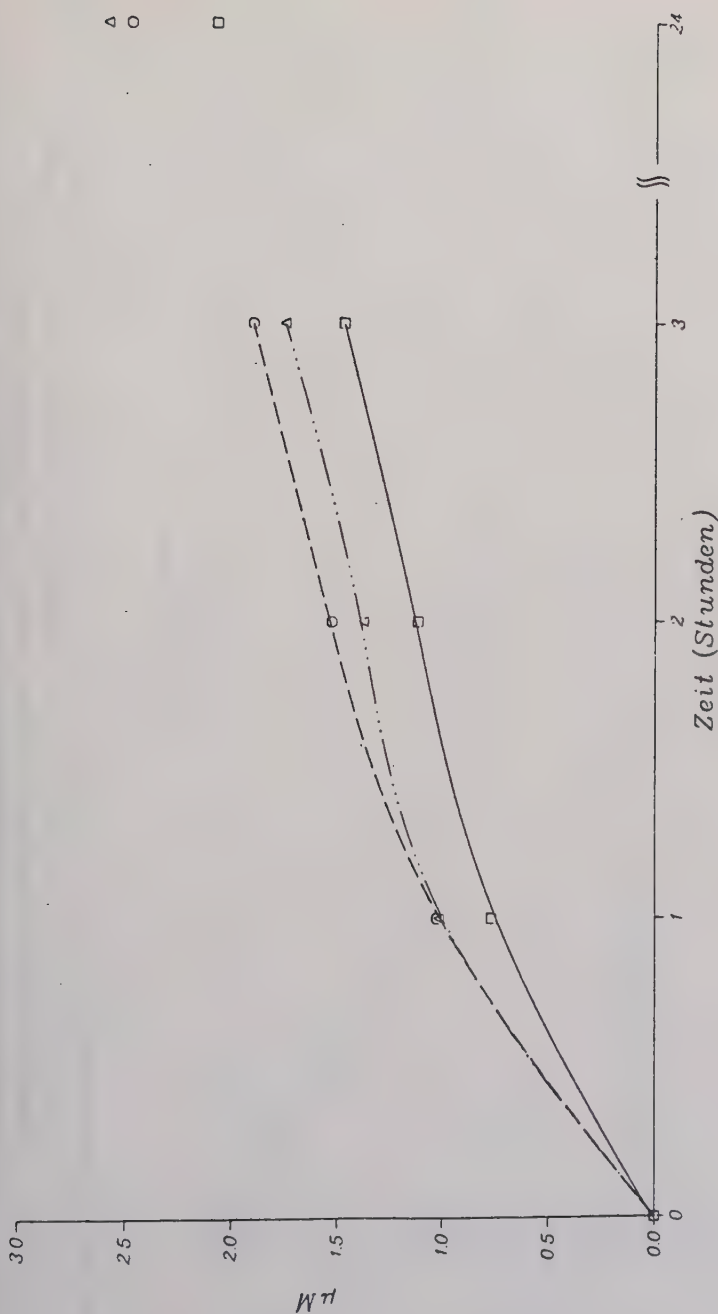
Durchschnittliche Glucoseaufnahme in $\mu\text{M}/\text{ml}$ Zellen von Erythrocyten (Δ) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A ($\square$) bzw. Puffer E ($\circ$), während Inkubation bei 20°C in 10mM Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer und in Adenosin in Abhängigkeit von der Zeit.

Abb. 11.1



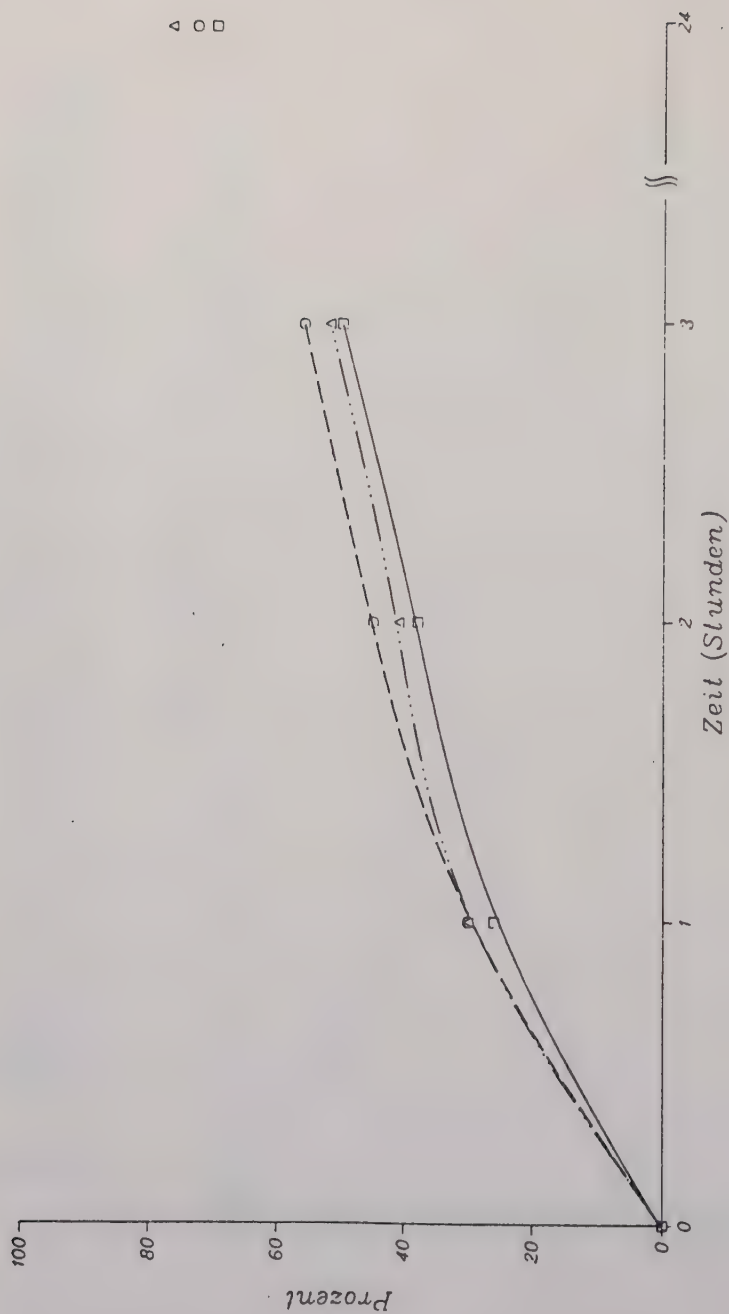
Durchschnittliche Glucoseaufnahme in % vom Ausgangswert von Erythrocyten (△) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (□) bzw. Puffer B (○), während Inkubation bei 20 °C in 10 mM Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer und in Adenosin in Abhängigkeit von der Zeit.

Abb. 11.2

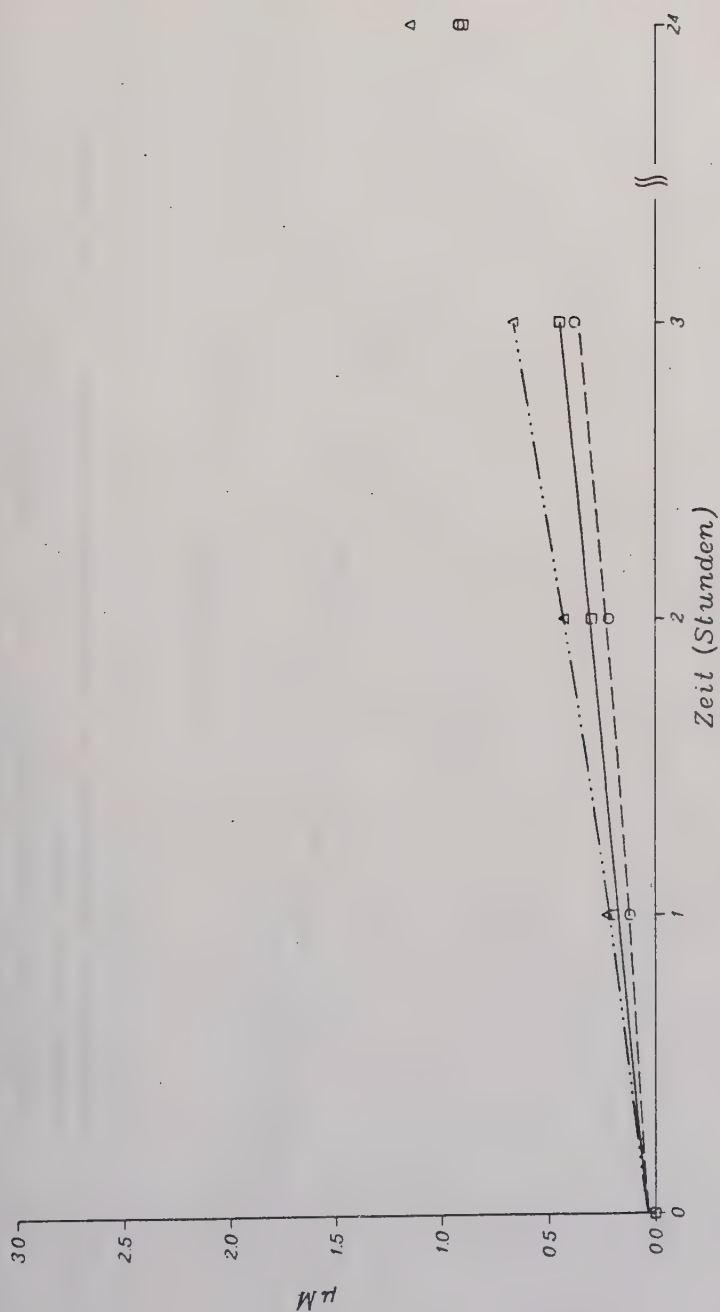


Durchschnittliche Glucoseaufnahme in $\mu\text{M}/\text{ml}$ Zellen von Erythrocyten (Δ) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A ($\square$) bzw. Puffer E ($\circ$), während Inkubation bei 37°C in 10 mM Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer und in Adenosin in Abhängigkeit von der Zeit.

Abb. 12.1

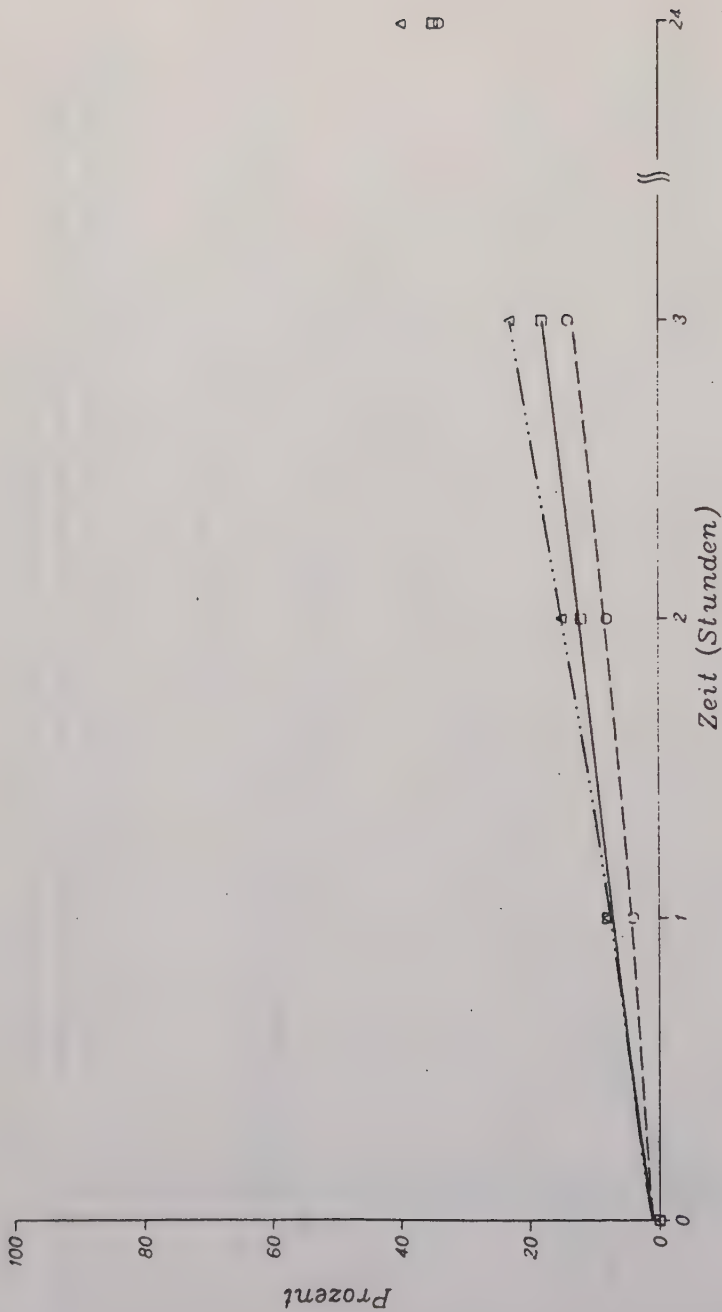


Durchschnittliche Glucoseaufnahme in % vom Ausgangswert von Erythrocyten (Δ) und Trägerserythrocyten, präpariert in Puffer A ($\square$) bzw. Puffer E ($\circ$), während Inkubation bei 37°C in 10 mM Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer und in Adenosinein Abhängigkeit von der Zeit.

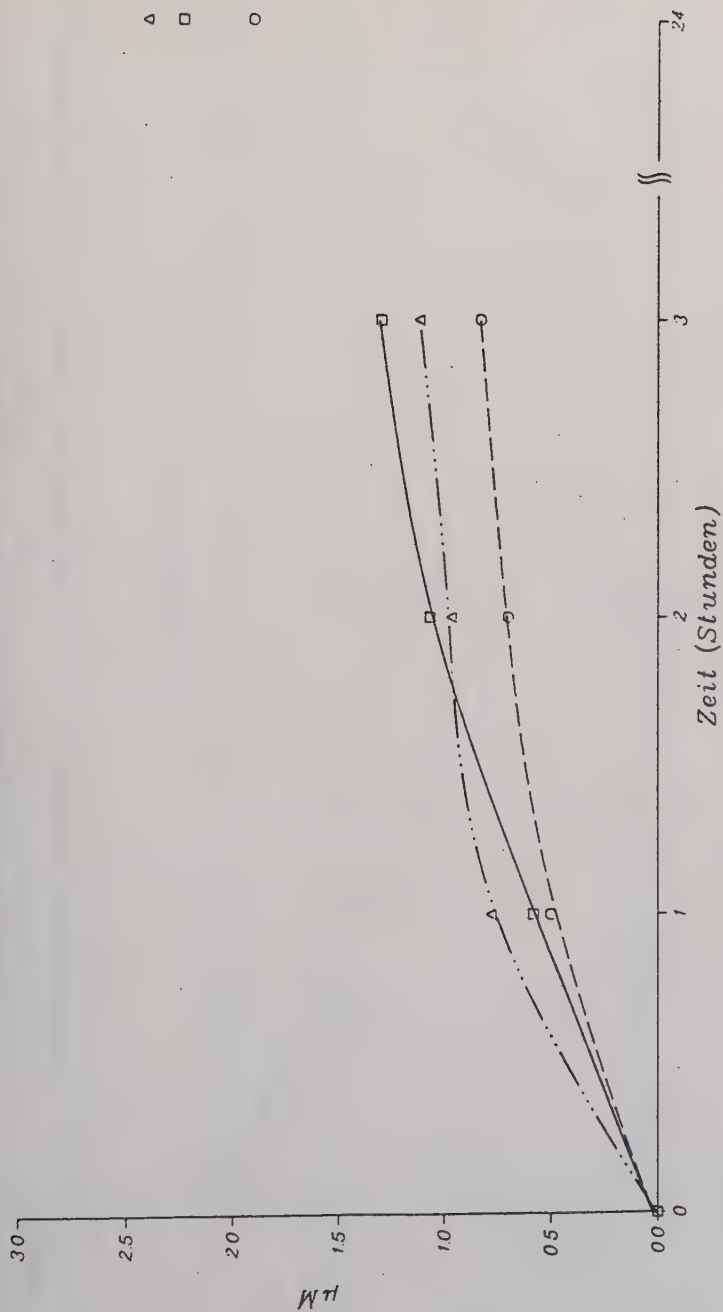


Durchschnittliche Glucoseaufnahme in $\mu\text{M}/\text{ml}$ Zellen von Erythrocyten (Δ) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A ($\square$) bzw. Puffer E ($\circ$), während Inkubation bei 20°C in 10mM Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer und in Inosine in Abhängigkeit von der Zeit.

Abb. 13.1

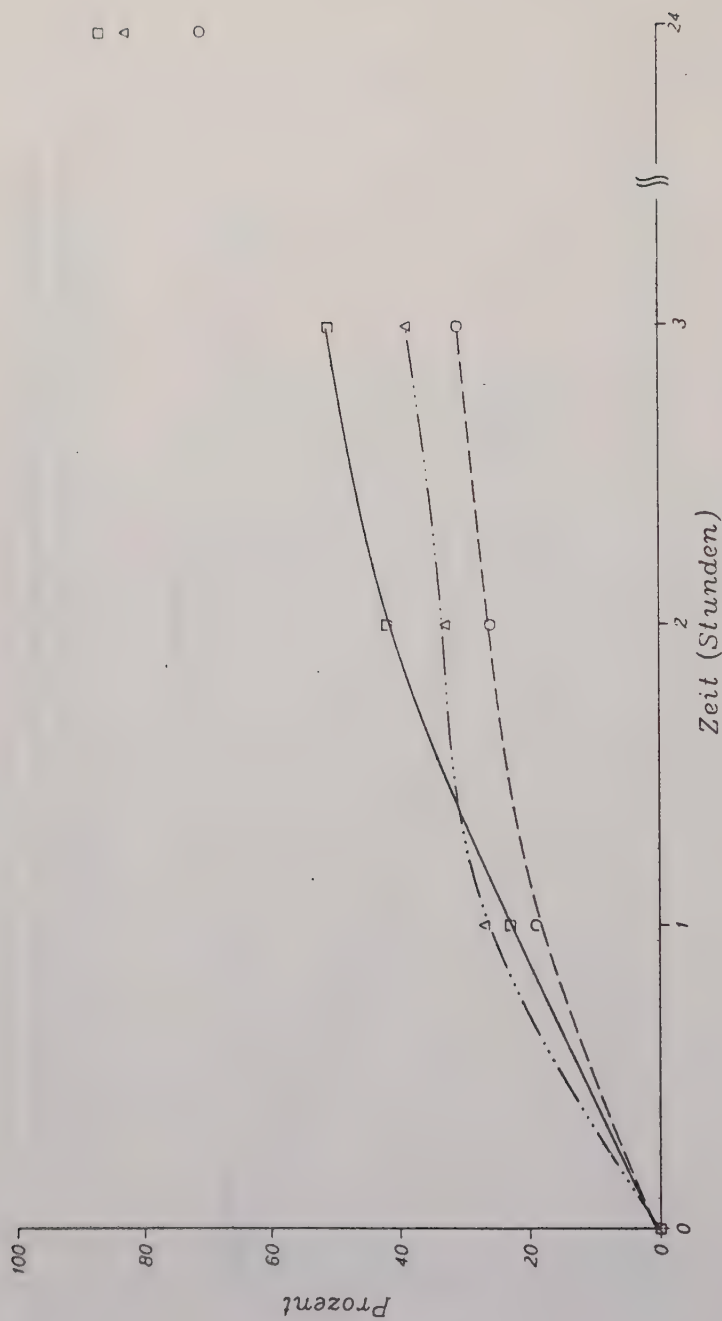


Durchschnittliche Glucoseaufnahme in % vom Ausgangswert von Erythrocyten (Δ) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A ($\square$) bzw. Puffer E ($\circ$), während Inkubation bei 20°C in 10 mM Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer und in Inosine in Abhängigkeit von der Zeit.

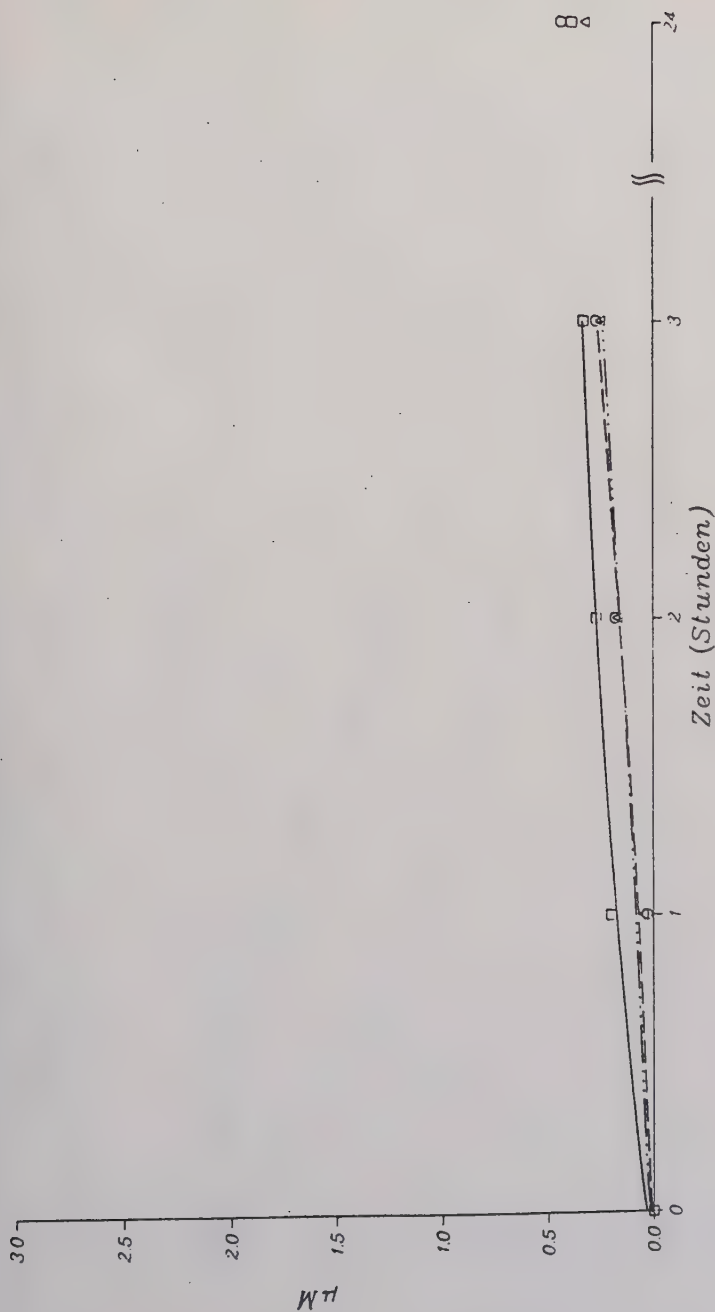


Durchschnittliche Glucoseaufnahme in $\mu M/ml$ Zellen von Erythrocyten (Δ) und Trägere erythrocyten, präpariert in Puffer A ($\square$) bzw. Puffer E ($\circ$), während Inkubation bei $37^{\circ}C$ in $10mM$ Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer und in Inosine in Abhängigkeit von der Zeit.

Abb. 14.1

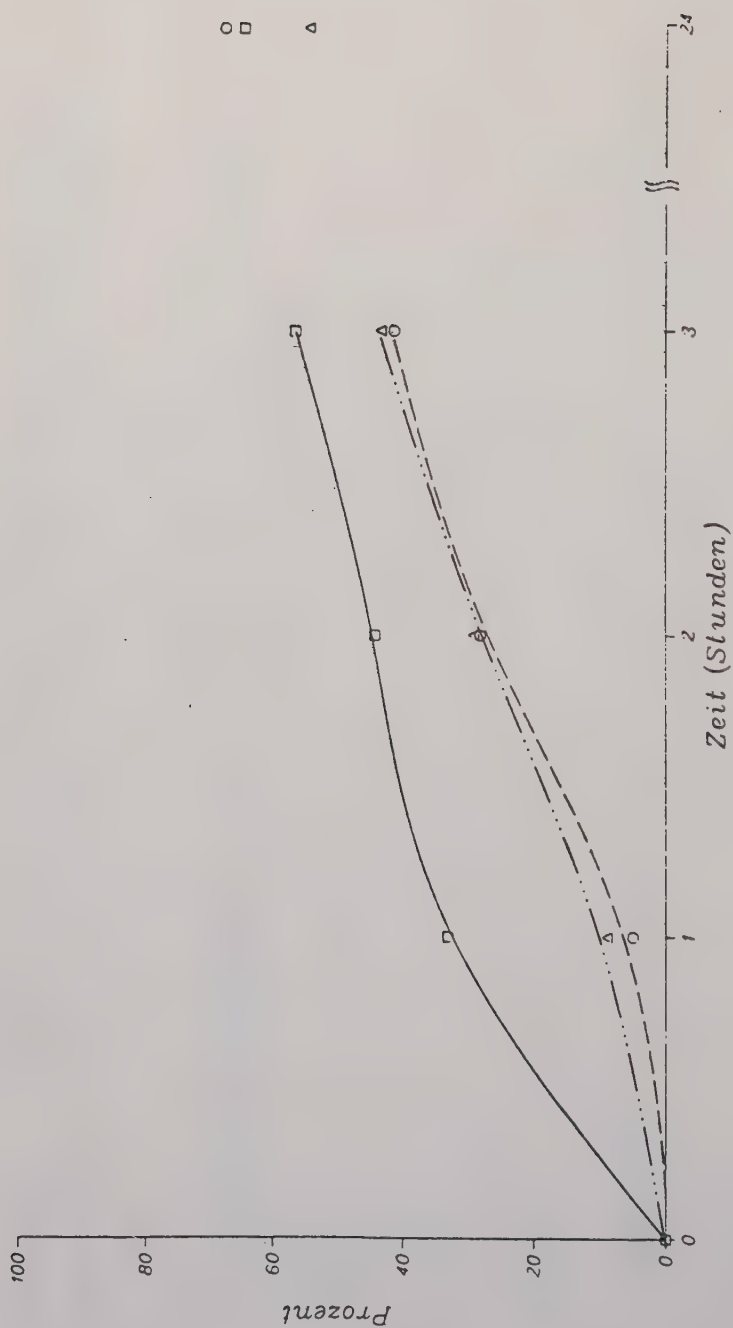


Durchschnittliche Glucoseaufnahme in % vom Ausgangswert von Erythrocyten (Δ) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (□) bzw. Puffer E (○), während Inkubation bei 37°C in 10 mM Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer und in Inosine in Abhängigkeit von der Zeit.

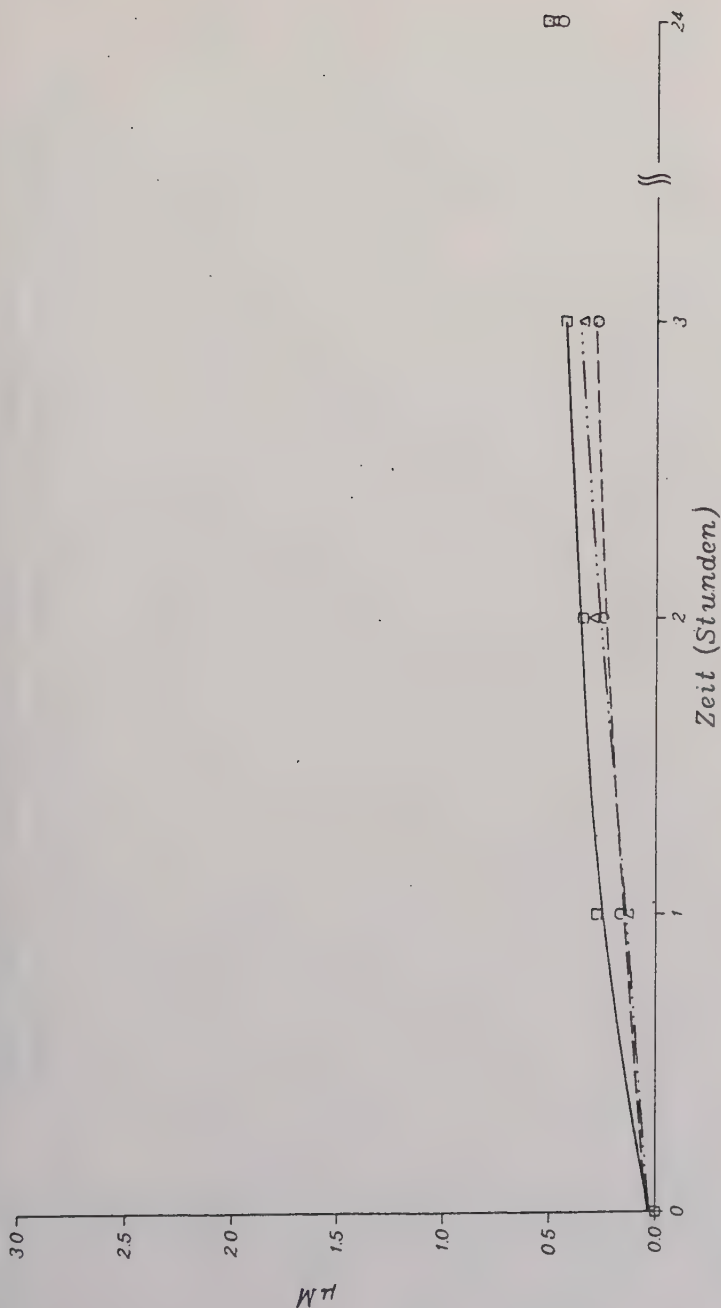


Durchschnittlicher Abfall von ATP in $\mu\text{M/ml}$ Zellen von Erythrocyten (Δ) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A ($\square$) bzw. Puffer E ($\circ$), während Inkubation bei 20°C in 5 mM Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer in Abhängigkeit von der Zeit.

Abb. 15.1

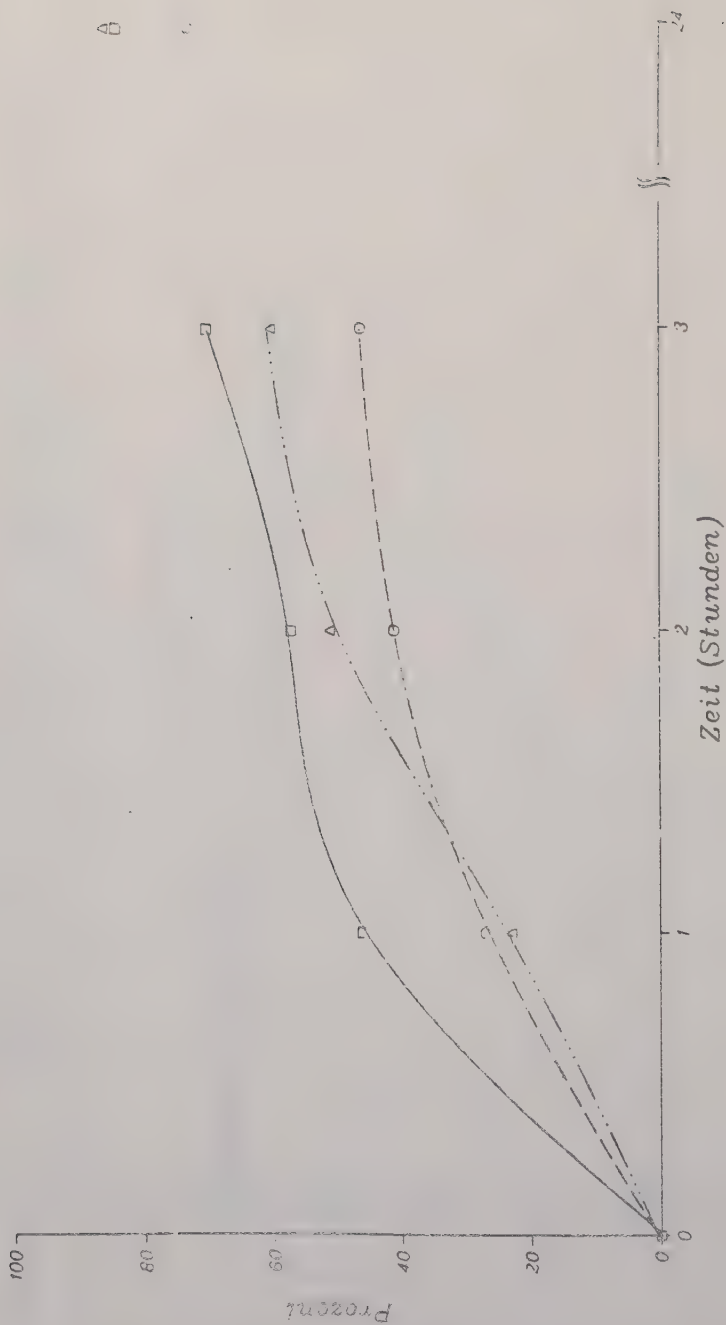


Durchschnittlicher Abfall von ATP in X vom Ausgangswert von Erythrocyten (△) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (□) bzw. Puffer E (○), während Inkubation bei 20 °C in 5 mM Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer in Abhängigkeit von der Zeit.

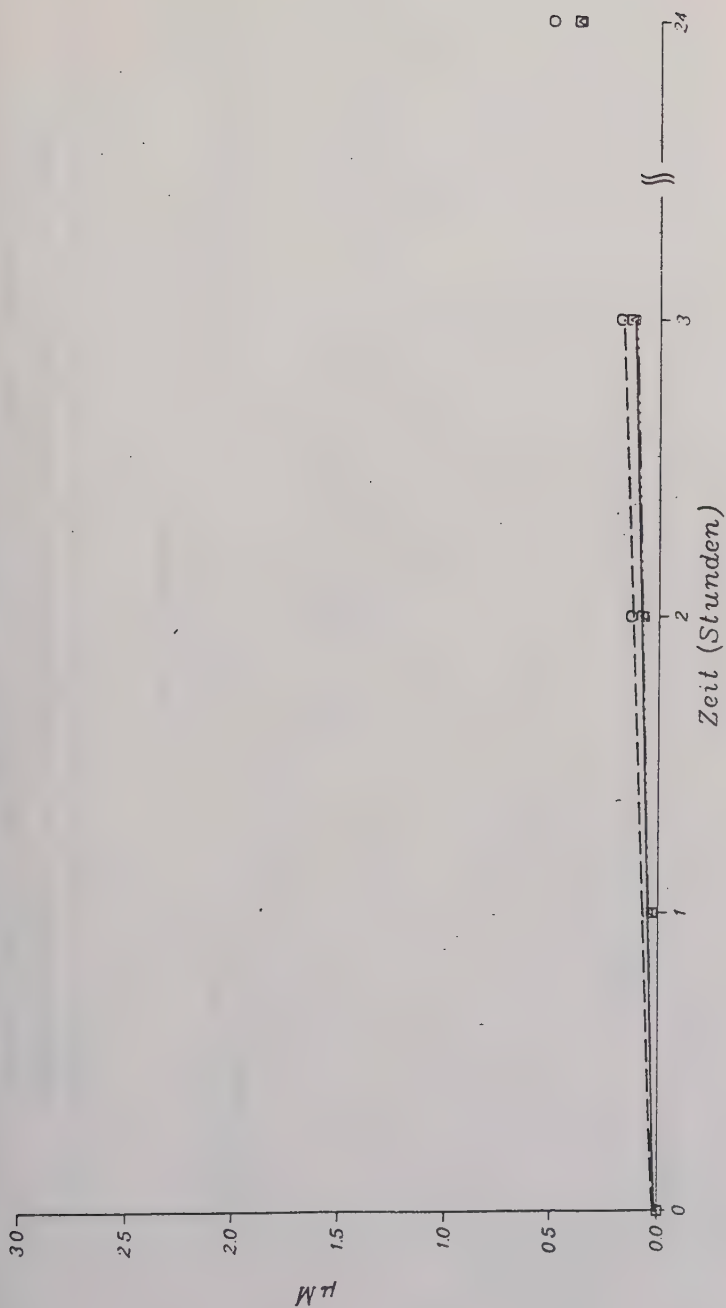


Durchschnittlicher Abfall von ATP in $\mu\text{M/ml}$ Zellen von Erythrocyten (Δ) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A ($\square$) bzw. Puffer E ($\circ$), während Inkubation bei 37°C in 5 mM Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer in Abhängigkeit von der Zeit.

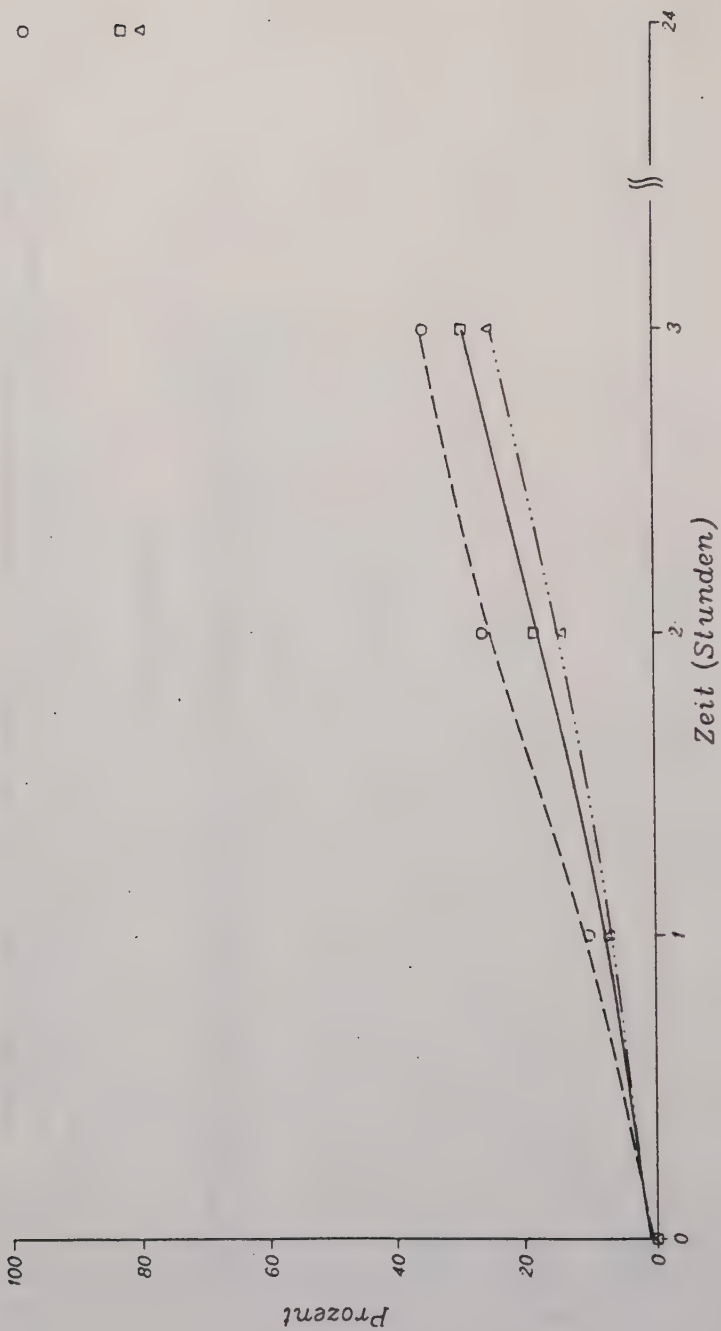
Abb. 16.1



Durchschnittlicher Abfall von ATP in % vom Ausgangswert von Erythrocyten (Δ) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A ($\square$) bzw. Puffer E ($\circ$), während Inkubation bei 37°C in 5 mM Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer in Abhängigkeit von der Zeit.

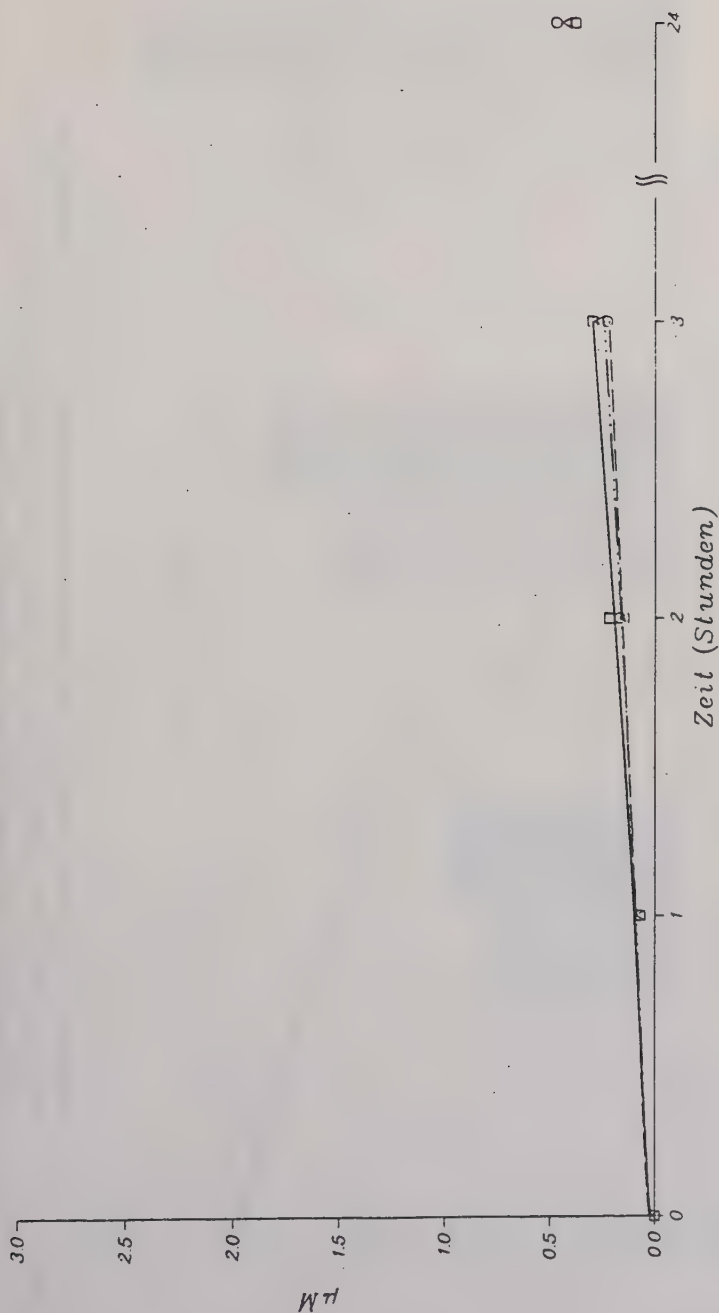


Durchschnittlicher Abfall von ATP in $\mu\text{M/ml}$ Zellen von Erythrocyten (Δ) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A ($\square$) bzw. Puffer E ($\circ$), während Inkubation bei 20°C in 10 mM Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer in Abhängigkeit von der Zeit.

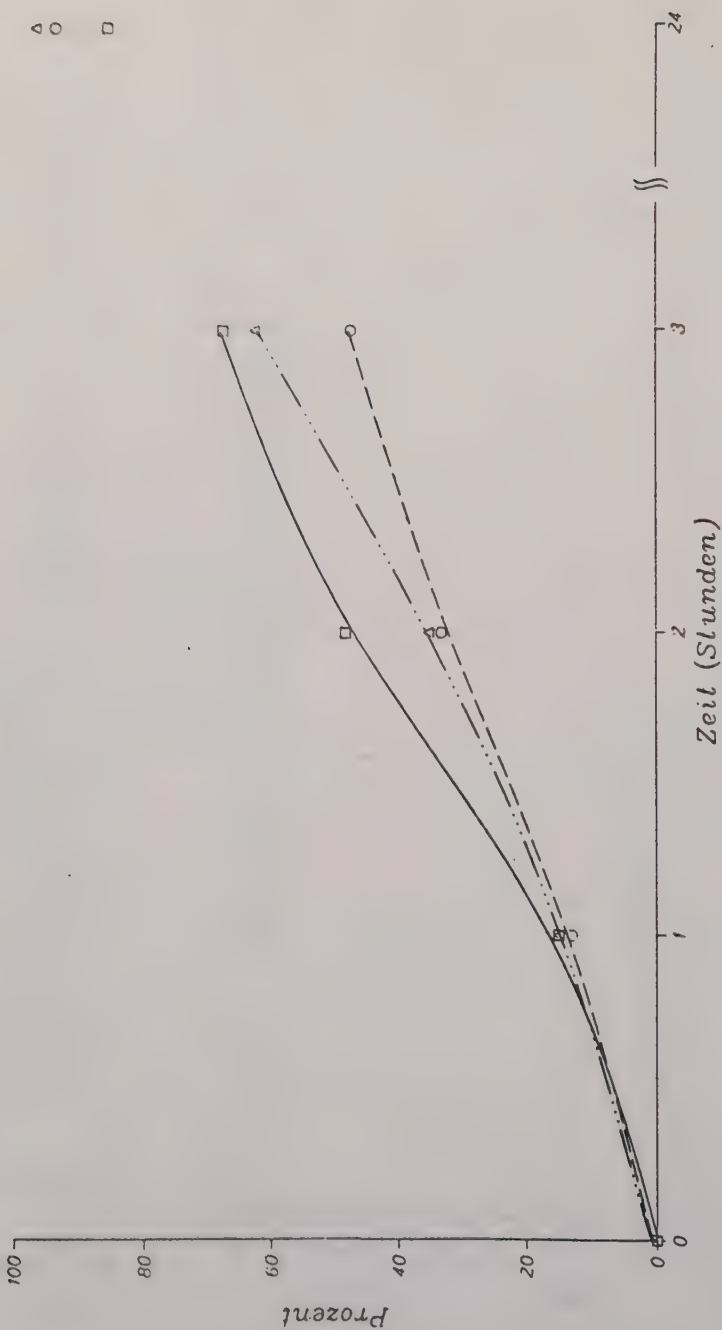


Durchschnittlicher Abfall von ATP in % vom Ausgangswert von Erythrocyten (△) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (□) bzw. Puffer E (○), während Inkubation bei 20 °C in 10 mM Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer in Abhängigkeit von der Zeit.

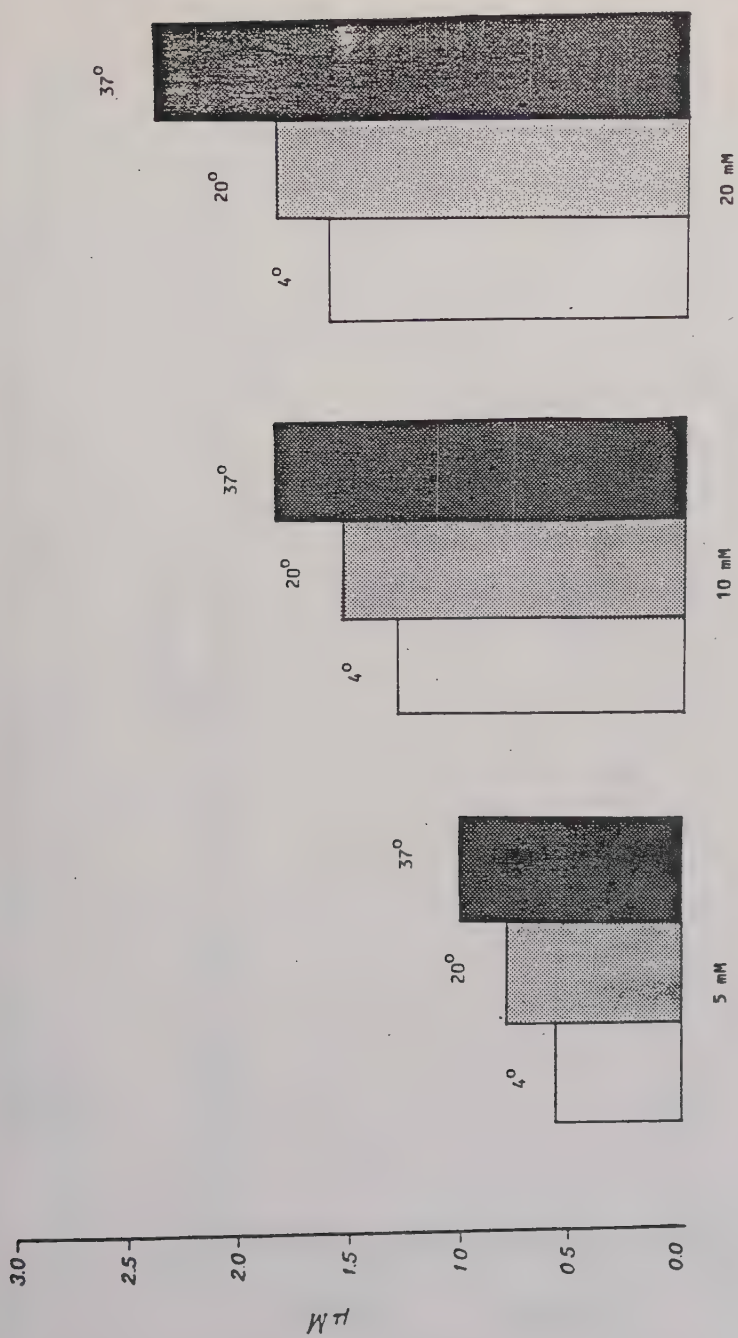
Abb. 17.2



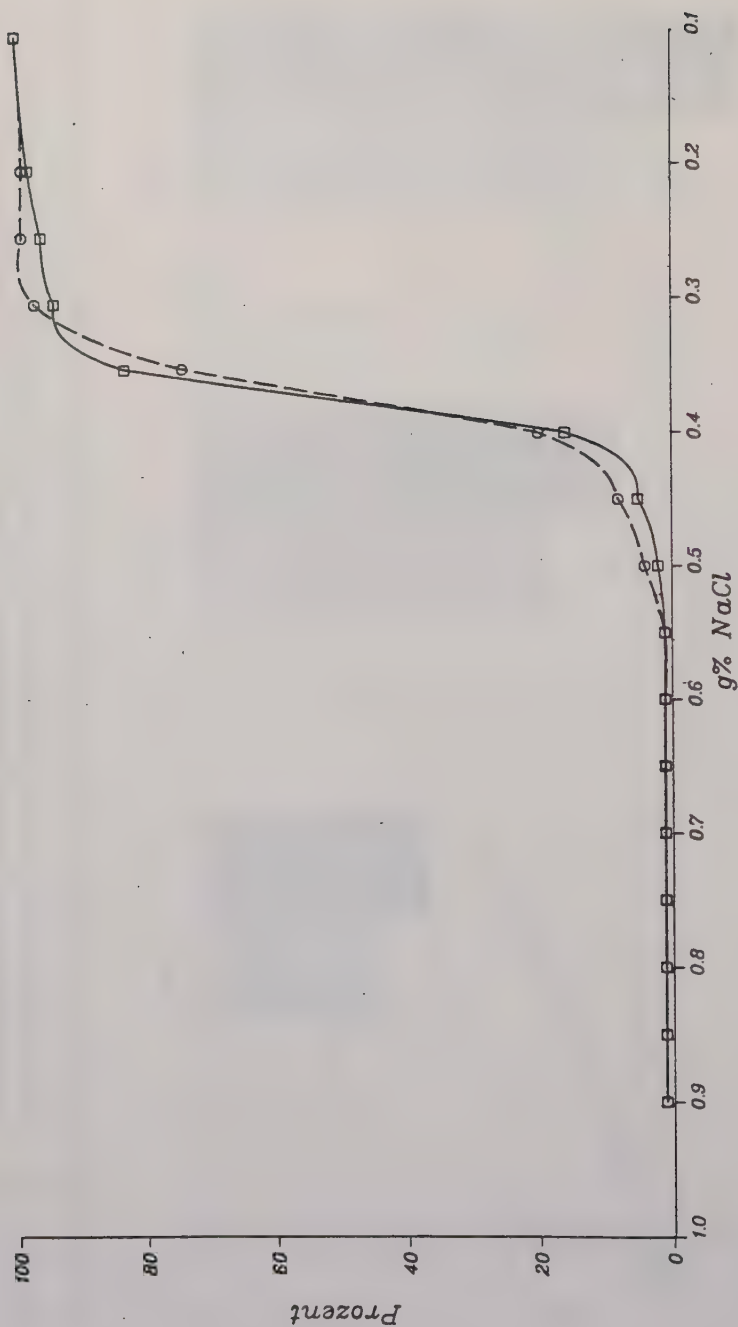
Durchschnittlicher Abfall von ATP in $\mu\text{M}/\text{ml}$ Zellen von Erythrocyten (Δ) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A ($\square$) bzw. Puffer E ($\circ$), während Inkubation bei 37°C in 10 mM Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer in Abhängigkeit von der Zeit.



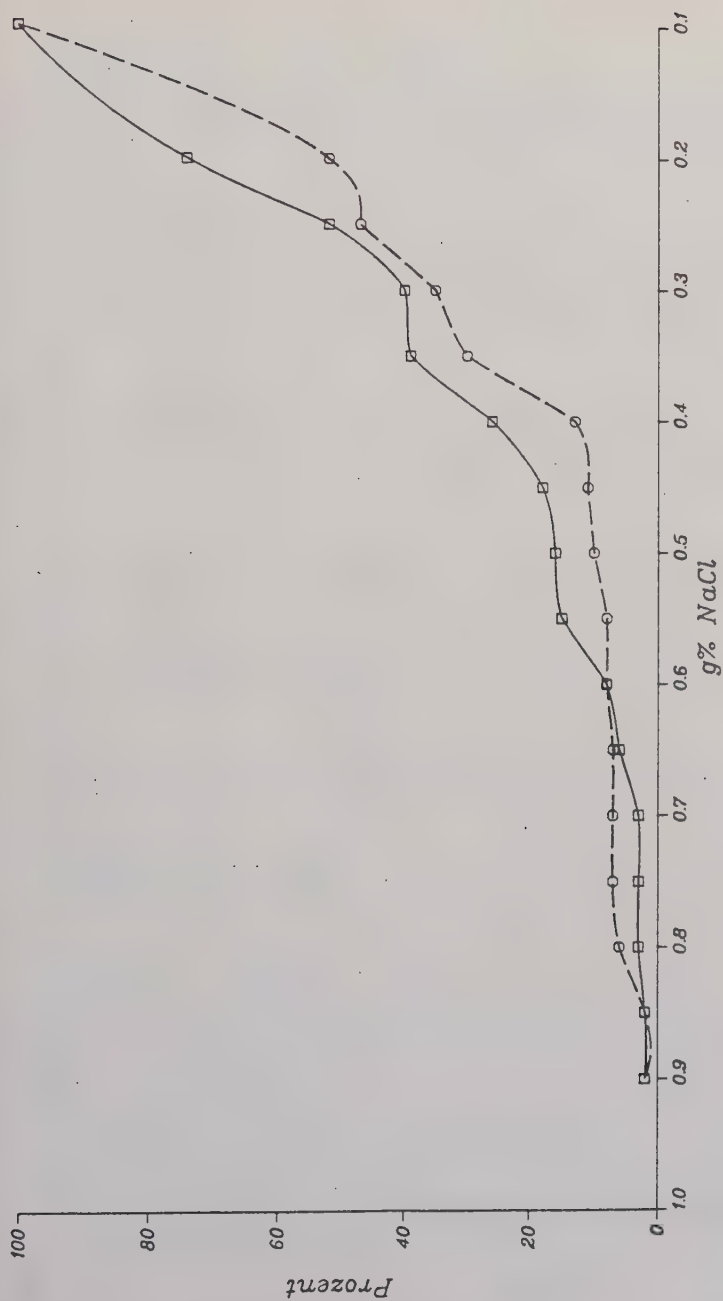
Durchschnittlicher Abfall von ATP in % vom Ausgangswert von Erythrocyten (△) und Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A (□) bzw. Puffer E (○), während Inkubation bei 37°C in 10 mM Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer in Abhängigkeit von der Zeit.



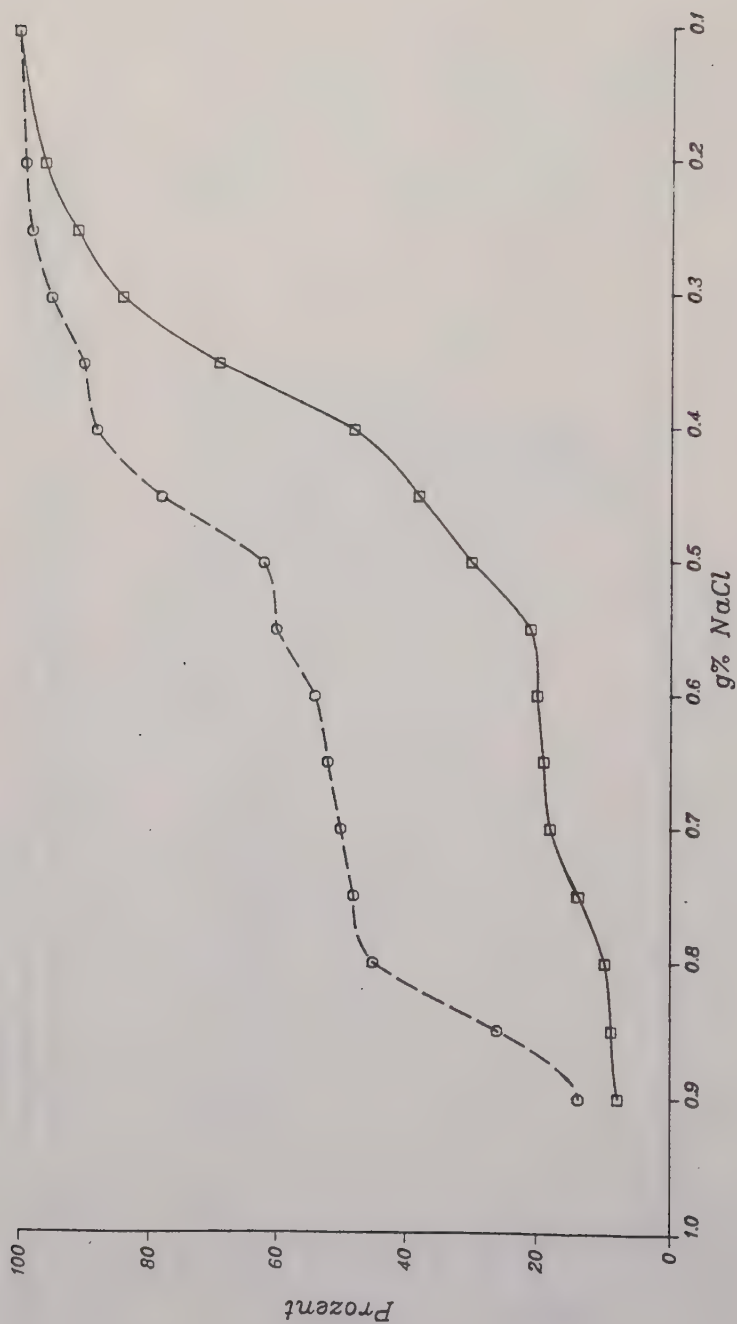
Darstellung der durchschnittlichen Glucoseaufnahme von Erythrocyten/Trägererythrocyten in $\mu\text{M/ml}$ Zellen in Abhängigkeit von der Temperatur und von der Molarität und von der Zeit (24 Stunden-Verbrauch)



Osmotische Resistenz normaler Erythrocyten während Inkubation bei 37 °C in 10 mM Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer in Abhängigkeit von der Zeit nach 0 Stunden (□) und nach 24 Stunden (○)



Osmotische Resistenz von Trägererythrocyten, präpariert in Puffer A, während Inkubation bei 37°C in 10 mM Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer in Abhängigkeit von der Zeit nach 0 Stunden (□) und nach 24 Stunden (○).



Osmotische Resistenz von Trägererythrocyten, präpariert in Puffer B, während Inkubation bei 37°C in 10 mM Glucose-Adenosin-Phosphat-Puffer in Abhängigkeit von der Zeit nach 0 Stunden (□) und nach 24 Stunden (○).

L I T E R A T U R - V E R Z E I C H N I S

1. ABABEI, L. & RAPAPORT, S. (1961)
Über die Adenosindesaminase von Kaninchen-Reticulocyten und -Erythrocyten. Acta Biol. Ger. 6, 288.
2. BARTLETT, G. R. (1972)
Incubation of human red cells, after storage for 8 weeks in ACD, with inosine+adenine and inosine + adenine + pyruvate; effects on nucleotids and phosphorylated carbohydrate intermediates. In Hemoglobin and Red Cell Structure and Function. ed. Brewer, Plenum Press, New York, 479 - 483.
3. BARTLETT, G. R. & SHAFER, A. W. (1961)
Phosphorylated carbohydrate during storage in acid citrate dextrose. II. Effect of the addition of inosine late in storage. J. clin. Invest. 40, 1185.
4. BEUTLER, E. (1975)
In Red Cell Metabolism. A Manual of biochemical Methods, 2nd edn, Grune and Stratton, New York, 149.
5. BEUTLER, E. & DURON, O. (1965a)
Effects of pH on preservation of red cell ATP. Transfusion 5, 17-19.
6. BEUTLER, E. & DURON, O. (1965b)
Factors influencing the preservation of red cell ATP on storage. Folia Haematol. (Leipzig) 83, 509.
7. BISHOP, C., (1962)
Maintenance of ATP level of incubated red cells by controlling the pH. Transfusion 2, 408.
8. BISHOP, C. (1961)
Purine metabolism in human blood studied in vivo by injection of C-14-adenine. J. biol. Chem. 236, 1778
9. BISHOP, C. (1962)
Maintenance of ATP level of incubated human red cells by controlling the pH. Transfusion 2, 408.
10. BISHOP, C. (1964)
Some in vitro effects of adenine added to stored blood. Transfusion 4, 265-267.

11. CASTLE, W.B. & DALAND, G.A. (1937)
Susceptibility of mammalian erythrocytes to hemolysis with hypotonic solutions. *Arch.Int.Med.* 60, 949.
12. CHALMERS, R.A., HUBBARD, A.R. & SPRANDEL, U. (1981)
Characteristics of erythrocyte ghosts prepared by dielectric breakdown. *Clin.sci* 60, 2-3.
13. CHAPMAN, S.J., ALLISON, J.V. & GRIMES, A.J. (1971)
Factors affecting the autohaemolysis of normal human red cells and the mechanism of lysis in vitro. *Scand.J.Haematol.* 8, 347.
14. CASTLE, W.B., HAM, T.H. & SHEN, S.C. (1950)
Observations on the mechanism of hemolytic transfusion reactions occurring without demonstrable hemolysin. *Trans.Ass.Am.Phycns.* 63, 161.
15. CONWAY, E.J. & COOKE, R. (1937)
Ammonia formation in shed blood and a characteristic deaminase of the blood stream. *Nature* 139, 627.
16. DALE, G.L., VILLACORTE, D.G. & BEUTLER, E. (1977)
High-yield entrapment of proteins into erythrocytes. *Biochem. Med.* 18, 220-225.
17. DANON, D., NEVO, A. & MARIKOVSKY, Y. (1954)
Preparation of erythrocyte ghosts by gradual hemolysis in hypotonic aqueous solution. *Bull Res.Council Israel* 6E, 36.
18. DAWSON, R.B., DABEZIER, M., HERSHEY, R.T., MYERS, C.S. (1978)
Blood preservations and hemoglobin oxygen affinity XXX: 2,3-DPG and its maintenance by ascorbate. *The Red Cell*, Alan R. Liss, ed. J. Brewer, New York, S. 627-648.
19. DAWSON, R.B., LOKEN, M.R. & CRATER, D.H. (1972)
Hemoglobin function in stored blood. IX. Preservative with pH to maintain red blood cell 2,3-DPG (Function) and ATP (Viability). *Transfusion* 12, 46.
20. DAWSON, R.B., EDINGER, M.C. & ELLIS, T.J. (1971)
Hemoglobin function in stored blood. IV. Red cell adenosine triphosphate and 2,3-DPG in acid-citrate-dextrose and citrat-phosphate-dextrose with adenine and inosine. *J.Lab.clin.med.* 77, 46.

21. DAWSON,R.B. & ELLIS,T.J. (1970)
Hemoglobin function of blood stored at 4 C. in ACD and CPD with adenine and inosine. Transfusion 10, 113.
22. DELOACH,J.R. & IHLER,G.M. (1977)
A dralysis procedure for loading erythrocytes with enzymes and lipids. Biochem.Biophys.Acta 496, 136-145
23. DELOACH,J.R., HARRIS,R.L. & IHLER,G.M. (1980)
An erythrocyte encapsulator dialyzer used in preparing large quantities of erythrocyte ghosts and encapsulation of a pesticide in erythrocyte ghosts. Anal.Biochem. 102, 220-227
24. DELOACH,J.R., BARTON,C. & CULLER,K. (1981)
Preparation of resealed erythrocytes and in vivo survival in dogs, Am.J.Vet.Res. 42(4), 664-666
25. DELOACH,J.R. & BARTON,C. (1981)
Glutaraldehyde treated carrier erythrocytes for organ targeting of Methotrexate in dogs. In Press
26. GABRIO,B.W., DONOHUE,D.M. & FINCH,C.A. (1955)
Erythrocyte preservation. V. Relationship between changes and viability of stored blood treated with adenosine. J.clin.Invest. 34, 1509-1510.
27. GABRIO,B.W. & FINCH,C.A. (1954)
Erythrocyte preservation. I. The relation of the storage lesios to in vivo erythrocyte senescences.J.clin.Invest. 33, 242-245.
28. GABRIO,B.W. & HUENNEKENS,F.M. (1955b)
Nucleoside metabolism of stored erythrocytes. Fed.Proc. 14. 217.
29. GABRIO,B.W. & HUENNEKENS,F.M. (1955a)
The role of nucleoside phosphorylase in erythrocyte preservation. Biochem.Biophys.Acta 18, 585-589.
30. GOLDEN G. & SHIELDS,R. (1971)
The maintenance of pH in stored blood. J.Med. 2, 395.

31. GREGORIADIS, G. (1979)
Drug Carriers in Biology and Medicine, VII. Energy metabolism in erythrocytes and erythrocytes ghosts, Academic Press, London, New York, 138-142.
32. GRIMES, A.J. (1980)
Human Red Cell Metabolism, Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, 279 - 286.
33. GUARINO, A.J. & SABLE, H.Z. (1955)
Studies on phosphomutases. II. Phosphoribomutase and phosphoglucomutase. J.biol.Chem. 215, 515.
34. GUEST, G.M. (1948)
Osmometric behavior of normal and abnormal erythrocytes. Blood 3, 541.
35. HOFFMAN, J.F., EDEN, M., BARR, J.S., & BEDELL, R.H.S (1958)
Hemolytic volume of human erythrocytes. J.Cell.Comp.Physiol. 51, 405.
36. HOFFMAN, J.F. (1958)
The physiological characteristics of human red blood cell ghosts. J.gen. Physiol. 42, 9-11.
37. HAM, T.H. & CASTLE, W.B. (1940)
Studies on destruction of red blood cells. Proc.Am.Philos.Soc. 82, 411.
38. HUBBARD, A.R., SPRANDEL, U. & CHALMERS, R.A. (1980a)
Organic acid transport in resealed haemoglobin-containing human erythrocyte "ghosts". Biochem.J. 190, 653 - 658.
39. HUBBARD, A.R., SPRANDEL, U. & CHALMERS, R.A. (1980b)
Dependence of mouse erythrocyte "ghosts" survival in vivo on cellular ATP concentrations. Biochem. Soc. Trans. 8, 578.
40. HUBBARD, R.A (1981)
Persönliche Mitteilungen, September 1981.
41. HUENNEKENS, F.M., GAFFREY, R.W., BASFORD, R.E., GABRIO, B.W. (1957)
Erythrocyte metabolism. IV. Isolation and properties of methemoglobin reductase. J.biol.Chem. 227, 261.

42. HUENNEKENS, F.M., NURK, E. & GABRIO, B.W. (1956)
Erythrocyte metabolism. I. Purine nucleoside phosphorylase. *J.biol.Chem.* 221, 971.
43. KATCHALSKY, A., KEDEM, O., KLIBANSKY, C. & DeVRIES, A. (1960)
Rheological considerations of the hemolysing red blood cell. In A.L.Copley, ed. *G.Stainsby, Flow Properties of Blood and Other Biological Systems*, Pergamon Press, New York, 155.
44. KWANT, W.O. & SEEMAN, P. (1970)
The erythrocyte is a perfect osmometer. *J.Gen. Physiol.* 55, 208.
45. LOWY, B.A., WILLIAMS, M.K. (1966)
Studies on the metabolism of adenosine and adenine in stored and fresh human erythrocytes. *Blood* 27, 623.
46. LOWY, B.A., JAFFE, E.R., VANDERHOFF, G.A., CROOK, L. (1958)
The metabolism of purine nucleosides by the human erythrocyte in vitro. *J.biol.Chem.* 230, 409.
47. LOWY, B.A., WILLIAMS, M.K., LONDON, I.M. (1962)
Enzymatic deficiencies of purine nucleotide synthesis in the human erythrocyte. *J.biol.Chem.* 237, 1622.
48. MANOHAR, S.V., DENSTEDT, O.F., RUBINSTEIN, D. (1967)
The metabolism of the erythrocyte. XVIII. Mechanism of incorporation of adenine into and resultant elevation of ATP and ADP in human erythrocytes. *Can.J.Biochem.* 45, 1153.
49. MEYSKENS, F.L. & WILLIAMS, H.E. (1971)
Adenosine metabolism in human erythrocytes. *Biochem.Biophys.Acta* 240, 170.
50. MOHANDAS, N., GREENQUIST, A.C., & SHOHET, S.B. (1978)
Effects of heat and metabolic depletion on erythrocyte deformability, spectrin extractibility and phosphorylation. *The Red Cell*, Alan R. Liss, ed. J. Brewer, New York, 453-472.
51. MOLLISON, P.L. & ROBINSON, M.A. (1959)
Observations on the effects of purine nucleosis on red-cell preservations. *Brit.J.Haematol.* 5, 331-334.

52. MURPHY, J.R. (1967)
The influence of pH and temperature on some physical properties of normal erythrocytes and erythrocytes from patients with hereditary spherocytosis. *J. Lab. Clin. Med.* 69, 758.
53. NAKAO, K., WADA, T., KAMIYA, T., NAKAO, M. & NAGANO, K. (1962)
A direct relationship between adenosine triphosphate level and in vivo viability of erythrocytes. *Nature* 194, 877.
54. NAKAO, M., NAKAO, T. & YAMAZOE, S. (1961)
A positive feedback mechanism of adenosine-triphosphate synthesis in erythrocytes. *Nature* 191, 283-285.
55. NAKAO, M., NAKAO, T., ARIMATSU, Y. & YOSHIKAWA, H. (1960a)
A new preservation medium maintaining the level of adenosine triphosphate and the osmotic resistance of erythrocyte. *Proc. Jpn. Acta.* 36, 43-47.
56. NAKAO, M., NAKAO, T., TATIBANA, M. & YOSHIKAWA, H. (1960b)
Shape transformation of erythrocytic ghosts on addition of adenosine triphosphate in longstored erythrocyte by incubation with inosine and adenosine. *J. Biochem.* 47, 661-663.
57. OVERGAARD-HANSEN, K., JORGENSEN, S. & PRAETORIUS, E. (1957)
Rephosphorylation produced by inosine and adenosine of adenosine monophosphate and adenosine diphosphate in human erythrocytes. *Nature* 179, 152-152.
58. PAGLIA, D.E., VALENTINE, W.N. & TARTAGLIA, A.P. (1978)
Control of red blood cell adenine nucleotide metabolism - studies of adenosine deaminase. *The Red Cell*, Alan R. Liss, ed. J. Brewer, New York, S. 319-335.
59. PONDER, E. (1948)
Haemolysis and Related Phenomena. Churchill, London. S.31 und 131.
60. PONDER, E. (1961)
The cell membrane and its properties. In *The Cell*, ed. J. Brachet & A.E. Mirsky, Academic press, New York, 2, 1.
61. PRANKERED, T.A.J. (1956)
Chemical changes in stored blood, with observations on the effects of adenosine. *Biochem. J.* 64, 209

62. PRANKERD, T.A.J. (1958)
The ageing of red cells. *J.Physiol.* 143, 325-326.
63. RUBINSTEIN, C.S. & ROSEN, O.M. (1973)
The role of cyclic AMP in the phosphorylation of proteins in human erythrocyte membranes. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 50, 421-425.
64. RUBINSTEIN, D. & DENSTEDT, O.F. (1956)
The metabolism of the erythrocyte. XIV. Metabolism of nucleosides by the erythrocyte. *Can.J.Biochem.* 34, 927.
65. RUBINSTEIN, D., KASHKET, S. & DENSTEDT, O.F. (1956)
Studies on the preservation of blood. IV. The influence of adenosine on the glycolytic activity of the erythrocyte during storage at 4 C. *Can.J.Biochem.* 34, 61-64.
66. RUBINSTEIN, D., KASHKET, S. & DENSTEDT, O.F. (1958)
Studies on the preservation of blood. IV. The influence of adenosine and inosine on the metabolism of the erythrocyte. *Can.J.Biochem.* 36, 1269.
67. SANDBERG, A.A., LEE, G.R., CARTWRIGHT, G.F. & WINTROBE, M.M. (1955)
Purine nucleoside phosphorylase activity of blood. I. Erythrocytes. *J.clin.Invest.* 34, 1823.
68. SHAFER, A.W. & BARTLETT, G.R. (1962)
Phosphorylated carbohydrate intermediates of the human erythrocyte during storage in acid citrate dextrose. III. Effect of incubation at 37 C. with inosine, inosine plus adenosine, and adenosine after storage for 6, 10, 14, and 18 weeks. *J.clin.Invest.* 41, 690-694.
69. SHAFER, A.W. & TROMBOLD, J.S. (1964)
Phosphorylated carbohydrate intermediates of the human erythrocyte during storage in acid citrate dextrose. IV. Effect of addition of adenosine, inosine, inosine plus adenosine, and adenosine at the beginning of storage. *Transfusion* 4, 120-122.
70. SHEETZ, M.P., SAWYER, D. & JACKOWSKI, S. (1978)
The ATP-dependent red cell membrane shape change: a molecular explanation. *The Red Cell*, Alan R. Liss, ed. J. Brewer, New York, 431-450.

71. SIMON, E.R. (1958)
The introduction of an adenine-supplemented preservative solution into U.S. blood services. *Prog.clin.biol.Res.* 21, 651.
72. SIMON, E.R., CHAPMAN, R.G. & FINCH, C.A. (1962)
Adenine in red cell preservation. *J.clin.Invest.* 41, 351.
73. SIMON, E.R. & SUGITA, Y. (1964)
Red cell preservation: addition of adenine to improve preservation in ACD-solution. *Bibl.Haematol.no.* 23, pt 3, 607.
74. SPRANDEL, U., HUBBARD, A.R., CHALMERS, R.A. (1979)
In vitro studies on resealed erythrocyte ghosts as protein carriers. *Res.Exp.Med.* 175.
75. SPRANDEL, U., HUBBARD, A.R. & CHALMERS, R.A. (1979)
Transport of uric acid and L-phenylalanine by released erythrocyte ghosts prepared by dialysis technique. *Biochem.Soc.Trans.* 7, 958.
76. SPRANDEL, U., HUBBARD, A.R., CHALMERS, R.A. (1979)
Membrane transport in resealed haemoglobin-containing human erythrocyte ghosts prepared by a dialysis procedure. *Biochem.Biophys.Res Commn.* 91, 79 f.
77. SPRANDEL, U. & CHALMERS, R.A. (1980a)
Morphologie von Erythrocytenschatten als in vivo Trägersysteme. *Verh.Dt.Ges.Inn.Med.* 86, 1090 f.
78. SPRANDEL, U., HUBBARD, A.R. & CHALMERS, R.A. (1980c)
Survival of "carrier erythrocytes" in dogs. *Clin. sci.* 59, 7-8.
79. SPRANDEL, U., HUBBARD, A.R. & CHALMERS, R.A. (1981a)
In vivo Überlebenszeit von Erythrocytenschatten als Trägersysteme für Pharmaka. *Verh.Dt.Ges.Inn.Med.* 87
80. SPRANDEL, U., HUBBARD, A.R. & CHALMERS, R.A. (1980)
Towards enzyme therapy using carrier erythrocytes. In *Clinical Research Centre Report, Medical Research Council, London 1980*, 147-150.

81. SPRANDEL, U., CLARK, J.B., CHALMERS, R.A. & HUBBARD, A.R., (1981d)
Morphology of haemoglobin-containing human erythrocyte ghosts. *Micron* 12, 29-36
82. SPRANDEL, U., HUBBARD, A.R. & CHALMERS, R.A. (1981)
Towards enzyme therapy using carrier erythrocytes. *J. Inher. Metabol.* 12.
83. SPRANDEL, U., HUBBARD, A.R. & CHALMERS, R.A. (1980)
In vivo life-span of resealed rabbit erythrocytes. *Res. Exp. Med. (Berlin)* 177, 13-17.
84. SPRANDEL, U., HUBBARD, A.R. & CHALMERS, R.A. (1981b)
Species-specific characteristics of resealed erythrocyte ghosts in vitro. *Biochem. Soc. Trans.* 8, 536-537.
85. STRUMIA, M.M. (1954)
Methods of blood preservation in general and preparation and use of red cell suspensions, *Am. J. clin. Pathol.* 24, 260-261.
86. STRUMIA, M.M. & STRUMIA, P.V. (1972)
The preservation of blood for transfusion. The effect of increased pH on addition of inosine only or adenine and inosine on the red cell function. *J. Lab. Med.* 79, 863-865.
87. SUGITA, Y. (1965), NOMURA, S. & YONEYAMA, Y. (1971)
Purification of reduced pyridine nucleotide dehydrogenase from human erythrocytes and methemoglobin reduction by the enzyme. *J. biol. Chem.* 246, 6072.
88. DE VERDIER, C.H. (1964)
Purification of 2,3-DPG phosphatase from human erythrocytes. *Biochem. J.* 92, 38.
89. DE VERDIER, C.H., HÜGMANN, C., GARBY, L., & KILLANDER, J. (1964b)
Storage of human red blood cells. II. The effect of pH and of the addition of adenine. *Acta physiol. Scand.* 60, 141.
90. WEED, R.I. & LACELLE, P.L. (1969)
ATP dependence of erythrocyte membrane deformability. Relation to in vivo survival and blood storage. In *Red Cell Membrane. Structure and Function*, eds. Jamieson & Greenwalt, Lippincott, Philadelphia, 318.

91. WEED, R.I. & REED, C.F. (1966)
Membrane alterations leading to red cell destruction.
Am. J. Med. 41, 681.
92. WHITTAM, R. (1960)
The support of active potassium transport in human red cells by nucleosides and desoxynucleosides. J. Physiol. 154, 608-609.
93. WHITTAM, R. & WHEELER, K.P. (1970)
Transport across cell membranes. Annu. Rev. Physiol. 32, 21.
94. WILLIAMS, T.F., FORDHAM, C.C., HOLLANDER, W., WELT, L.G. (1959)
Study of the osmotic behavior of the human erythrocyte. J. Clin. Invest. 38, 1587-1592.
95. YOUNG, L.E. (1955)
Hereditary spherocytosis. Am. J. Med. 18, 486.
96. ZIMMERMANN, U., RIEMANN, F. & PILWAT, G. (1976)
Enzyme loading of electrically homogenous human red cell ghosts prepared by dielectric breakdown. Biochem. Biophys. Acta 436, 460 - 474.

D A N K S A G U N G

Herrn Prof. Dr. N. Zöllner danke ich für die Überlassung des
Themas. Herrn Dr. U. Sprandel sei für seine stetigen
kritischen Ratschläge gedankt, die zur Entstehung der Arbeit
beitrugen.

LEBENS LAUF

Franz S T A R K, geb 17. September 1945 in Oberstdorf als Sohn des Dr.med. Theo Stark und seiner Ehefrau Magdalena, geb. Lacher.

1952 - 1957 Volksschule Hohenschäftlarn

1957 - 1966 Staatliches Gymnasium Kaufbeuren

1966 Abitur am Staatlichen Gymnasium Kaufbeuren

1967 - 1971 Mitarbeiter der Firma IBM in München als Systems Engineer für Datenverarbeitung

1971 - 1980 Mitarbeiter der AKDB (Anstalt für Kommunale Datenverarbeitung in Bayern)

1974 - 1980 Studium der Humanmedizin in München

1980 Approbation November 1980

